

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Angefertigt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar
der Technischen Universität München

(Priv.-Doz. Dr. med. Güralp Ceyhan)

**Zur Rolle der schwannzell-assoziierten
Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM in der neuralen
Karzinomzellinvasion im Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Natascha Gisela Klose
aus München

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Neoplasien des exokrinen Pankreas bei domestizierten Tieren.....	3
1.1	Ätiologie und Pathogenese.....	4
1.2	Histopathologie	4
1.3	Epidemiologie	5
1.4	Symptome	5
1.5	Diagnose.....	5
1.6	Therapie und Prognose.....	6
2	Mausmodelle in der Pankreaskrankung	7
3	Pankreaskarzinom beim Menschen.....	9
3.1	Ätiologie.....	9
3.2	Pathophysiologie	10
3.3	Epidemiologie	11
3.4	Symptome	11
3.5	Diagnose.....	12
3.6	Therapie.....	13
3.7	Prognose	15
4	Pankreatische Sternzellen in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms.....	15
5	Neurale Invasion im Pankreaskarzinom.....	16
6	Adhäsionsmoleküle auf hSC.....	20
6.1	Schwannsche Zellen.....	20
6.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	21
6.2.1	NrCAM	22
6.2.2	L1CAM	24
III	ZIEL DER ARBEIT	26
IV	MATERIAL UND METHODEN.....	30
1	Materialien.....	30
1.1	Apparaturen.....	30
1.2	Verbrauchsmaterialien	32

1.3	Chemikalien	33
1.4	Puffer und Lösungen	36
1.5	Zellkulturmedien	38
1.6	Zellen	39
1.7	Antikörper	40
1.7.1	Primärantikörper	40
1.7.2	Sekundärantikörper	41
1.8	Primer	41
1.9	Patientenkollektiv und Gewebe	42
1.10	Software	42
2	Methoden	43
2.1	<i>Histologische Untersuchungen</i>	43
2.1.1	Histologische Aufbereitung der Gewebeproben	43
2.1.2	Immunhistochemie NrCAM	44
2.1.3	Immunhistochemie L1CAM	45
2.1.4	Quantitative Auswertung der Immunoreaktivität	45
2.1.5	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	47
2.1.6	Klassifizierung der neuralen Invasion	47
2.1.7	Immunhistochemie	48
2.2	<i>Molekularbiologische Untersuchungen</i>	49
2.2.1	Aufbereitung der Lysate zur Untersuchung mittels Western blot	49
2.2.2	SDS-Page	50
2.2.3	Western blot NrCAM	51
2.2.4	Western blot L1CAM	52
2.2.5	Western blot GAPDH	54
2.2.6	Aufbereitung von Gewebelysaten zur Untersuchung mittels PCR	55
2.2.7	Aufbereitung von Zelllysaten zur Untersuchung mittels PCR	57
2.2.8	PCR	57
2.2.9	qRT-PCR	60
2.3	<i>Zellbiologische Untersuchungen</i>	63
2.3.1	Kultivierung der Zellen	63
2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	64
2.3.3	Isolation von pankreatischen Sternzellen aus der Ratte	65
2.3.4	Lebendzellfärbung mit CFDA	66

2.3.5	Adhäsionsassay	66
2.3.6	3D in-vitro Migrationsassay	71
2.4	<i>Statistik</i>	76
V	ERGEBNISSE	78
1	Expressionsprofil der CAMs auf den hSC	78
1.1	Basisexpressionsprofil von NrCAM	78
1.2	Basisexpressionsprofil von L1CAM	81
2	Expressionsanalyse der CAMs im Pankreasgewebe	85
2.1	Expression von NrCAM im NP und im PCa	86
2.2	Expression von L1CAM im NP und im PCa	88
3	Expression der CAMs auf PCC	90
3.1	Expression von NrCAM auf SU86.86 und MiaPaCa-2	90
3.2	Expression von L1CAM auf SU86.86 und MiaPaCa-2	92
4	Expression von NrCAM auf Bindegewebszellen	94
5	Korrelation der neuralen Expression der CAMs mit der neuralen Invasion im humanen Pankreaskarzinom	96
5.1	NrCAM	96
5.2	L1CAM	97
6	Korrelation der neuralen Expression der CAMs mit Schmerz	98
6.1	NrCAM	99
6.2	L1CAM	99
7	Identifizierung der Spezifität der Migration der hSC	100
8	Einfluss der CAMs auf die Interaktion zwischen hSC und PCC	102
8.1	Einfluss von NrCAM auf die Zell-Zell-Adhäsion	103
8.2	Einfluss von L1CAM auf die Zell-Zell-Adhäsion	104
8.3	Einfluss von L1CAM auf das Migrationsverhalten der hSC	107
VI	DISKUSSION	112
VII	ZUSAMMENFASSUNG	124
VIII	SUMMARY	126
IX	LITERATURVERZEICHNIS	128

X	ANHANG	149
1	Abkürzungsverzeichnis.....	149
2	Abbildungsverzeichnis.....	151
XI	DANKSAGUNG	154

I EINLEITUNG

Die Anzahl der Pankreaskarzinom-Neuerkrankungen ist mit etwa 15.000 pro Jahr sehr niedrig (Kaatsch, Spix et al. 2012). Dennoch stellt das humane Pankreaskarzinom die vierthäufigste krebssbedingte Todesursache in Deutschland dar (Kaatsch, Spix et al. 2012). Mit einer relativen Fünfjahresüberlebensrate von 7 bis 8% weist es die niedrigste Überlebensrate unter allen Tumorerkrankungen auf (Kaatsch, Spix et al. 2012). Während Inzidenz und Mortalität anderer verbreiteter Tumorerkrankungen tendenziell sinken, steigt die Anzahl der Neuerkrankungen und der durch das Pankreaskarzinom verursachten Todesfälle über die Jahre stetig an (Vincent, Herman et al. 2011).

Diese Situation lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass bis heute keine sensitive und wenig invasive Methode zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms existiert (Adler, Seufferlein et al. 2007). Das späte Auftreten und das Fehlen von charakteristischen Symptomen trägt noch dazu bei, dass sich das Pankreaskarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits meist in einem fortgeschrittenen Stadium befindet (Seeber 2003). Die einzige kurative Therapie stellt bis heute immer noch alleine die chirurgische Resektion des Tumors dar. Diese ist jedoch bei Diagnosestellung aufgrund des aggressiven Wachstums und der frühen Metastasenbildung dieser Tumorentität nur in 10 bis 15% der Fälle möglich (Hilbig und Oettle 2010). Zusätzlich erschwerend ist die Tatsache, dass das Pankreaskarzinom eine eingeschränkte Chemosensitivität aufweist (Hilbig und Oettle 2010) und zu lokalen Rezidiven und Fernmetastasen neigt (Reni 2012).

Neben der erschwerten Diagnose und den begrenzten Therapiemöglichkeiten zeichnet sich die Malignität des Pankreaskarzinoms durch die schwerwiegenden Symptome im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung aus (Lee, Cheng et al. 2012). Dazu zählen allgemeine paraneoplastische Syndrome wie Hyperthermie oder Thrombosen. Bei 47% der Patienten kommt es zu einem meist schmerzlosen Ikterus, 60% verlieren deutlich an Gewicht und bis zu 80% leiden an moderaten bis starken Schmerzen (Fazal und Saif 2007). Vor allem diese zum Teil sehr massiven Schmerzen führen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität und sind schwer zu behandeln (Sharfman und Walsh 1990).

Lokale Nervenveränderungen und die Invasion der Nerven durch Pankreaskarzinomzellen (PCC) sind ebenfalls charakteristisch für das Adenokarzinom des Pankreas (Ceyhan, Demir et al. 2009). Die Ausbreitung der PCC entlang der Nerven erschwert zum einen die kurative Resektion und führt damit häufig zu Lokalrezidiven, zum anderen ist sie meist für das typische Schmerzleiden der Patienten mitverantwortlich (Ceyhan, Müller et al. 2005).

Die neurale Invasion beruht vor allem auf der Wechselwirkung zwischen Karzinomzellen und Nerven. Die Beeinflussung dieser Interaktion ist bisher wenig erforscht, bietet jedoch vielversprechende Therapieoptionen. Die bis heute durchgeführten Studien auf diesem Gebiet befassen sich vornehmlich mit der Affinität der PCC zu den Nervenfasern. Die Wechselwirkung zwischen der glialen Komponente der peripheren Nerven, den humanen Schwannschen Zellen (hSC) und den PCC wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht erforscht. Eine nicht publizierte Studie der Arbeitsgruppe Ceyhan zeigte jedoch, dass bei der neuralen Invasion nicht nur die Affinität der PCC zu den neuralen Strukturen eine wichtige Rolle spielt, sondern auch die zielgerichtete Migration der hSC zu den PCC. Dieses Erkenntnis zeigt, dass der glialen Komponente der Nerven bei der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom eine bedeutendere Rolle zukommt als bisher vermutet. Es wird deutlich, dass im Rahmen der Erforschung der neuralen Invasion die hSC mehr in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses rücken sollten. Swanson konnte in diesem Zusammenhang bereits Moleküle identifizieren, die durch eine spezifische Bindung aneinander die Adhäsion von PCC an den hSC vermitteln können (Swanson, McDermott et al. 2007). Eine intensivere Erforschung weiterer myelinassoziierter Moleküle, die zur Zell-Zell-Adhäsion zwischen PCC und hSC beitragen, ist nötig, um die potentielle Rolle der glialen Komponente der Nerven bei der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom genauer zu identifizieren. Längerfristig gesehen würde dies völlig neue Therapieansätze eröffnen, die sowohl zu einer Reduktion der Schmerzen als auch zu einer Reduktion der Lokalrezidivrate beim Pankreaskarzinom beitragen könnten.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Neoplasien des exokrinen Pankreas bei domestizierten Tieren

Man unterscheidet primäre und sekundäre Neoplasien des exokrinen Pankreas. Die primären Neoplasien unterteilen sich wiederum in maligne und benigne. Adenome sind benigne, extrem seltene Neoplasien des Pankreas und spielen nur bei Katzen eine Rolle. Sie unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer Kapsel von der nodulären Hyperplasie des Pankreas. Das Adenokarzinom ist eine maligne Neoplasie des exokrinen Pankreas. (McGavin und Zachary 2009)

Die Inzidenz maligner Neoplasien des exokrinen Pankreas bei domestizierten Tieren ist sehr niedrig. Rowlatt wertete Fälle aus, über die bis einschließlich Mitte 1966 berichtet wurde (Rowlatt 1967). Er beschrieb 94 Karzinome bei Hunden, 38 bei Katzen, 8 bei Rindern und 3 bei Pferden. Priester sammelte von März 1964 bis Dezember 1972 Daten von insgesamt 11 veterinärmedizinischen Colleges in den USA und Kanada (Priester 1974). Von insgesamt 10500 mikroskopisch bestätigten primären Tumoren waren 54 Pankreaskarzinome. Davon wurden 42 bei Hunden, 9 bei Katzen, 2 bei Rindern und ein Karzinom beim Pferd festgestellt. Basierend auf diesen Daten wurde die Häufigkeit von Pankreastumoren bei den verschiedenen Tierarten abgeschätzt. Bei der Katze waren 1,1% aller bestätigten primären Tumoren Pankreaskarzinome, beim Hund 0,6%, beim Rind 0,3% und beim Pferd 0,1% (Priester 1974).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Pankreaskarzinom bei allen Tierarten im Vergleich zum Menschen relativ selten vorkommt. Am ehesten ist es bei Hund und Katze zu finden.

1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Neoplasien des exokrinen Pankreas ist gänzlich unbekannt. Adenome können durch Massenzunahme zu Organverlagerungen des kranialen Abdomens und zu Obstruktionen des Gangsystems führen, bleiben in den meisten Fällen jedoch subklinisch (Horzinek 2005). Das Adenokarzinom kann zudem mit Gewebnekrose und Steatitis assoziiert sein (Banner, Alroy et al. 1978). Es wächst lokal invasiv und neigt zur frühen und ausgeprägten Metastasierung in viele benachbarte oder entfernte Organe. Neben Leber, Mesenterium, Darm und Lunge sind vor allem die regionären Lymphknoten betroffen (Steiner 2011).

1.2 Histopathologie

Das Adenokarzinom des Pankreas geht entweder von den Epithelzellen der Azini oder von den Ausführungsgängen des Pankreas aus. Mehrere ultrastrukturelle Studien haben wichtige Hinweise dafür geliefert, dass sowohl bei der Katze als auch beim Hund das Karzinom seinen Ursprung vor allem in den Azinuszellen hat (Banner, Alroy et al. 1978; Banner, Alroy et al. 1979; Pavone, Manuali et al. 2011). Man spricht demnach bei Hund und Katze eher von einem azinären Adenokarzinom. Die histologischen Eigenschaften des Karzinoms sind beim Tier sehr variabel. Die Gestalt der Karzinomzellen unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Lokalisation im Tumor sehr stark (Anderson und Johnson 1967). Sie sind häufig tubulär säulenförmig angeordnet. Das Ausmaß von Bindegewebsreaktionen kann ebenfalls sehr unterschiedlich sein. Meist werden die Tumore diskontinuierlich von mit Karzinomzellen infiltriertem Bindegewebe umgeben (Dennis, O'Brien et al. 2008). Interessanterweise wurde beim Hund vergleichbar mit dem Menschen eine Invasion entlang der Nervenscheiden beschrieben (Moulton 1978).

1.3 Epidemiologie

Das Adenokarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie des Pankreas bei Hund und Katze. Im Gegensatz zum Menschen wird der Tumor dort jedoch relativ selten diagnostiziert, obwohl das Adenokarzinom des Pankreas bei der Katze zunehmend häufiger vorzukommen scheint (Kraft, Dürr et al. 2003). Garvey berichtet bei der Katze von einer Inzidenz von etwa 0,5% (Garvey und Zawie 1984). Es sind vor allem ältere Tiere betroffen, beim Hund spricht man von einem Durchschnittsalter von 10,5 Jahren in einem Bereich von 5 bis 17 Jahren.

Es wird eine Rasseprädisposition für Cockerspaniel, Boxer, Springer Spaniel und Airedale Terrier vermutet (Kessler 2005; Christoph 2007; Nelson 2010).

1.4 Symptome

Tiere mit einem Adenokarzinom des Pankreas zeigen meist sehr unspezifische klinische Symptome. Das Krankheitsgeschehen kann sowohl akut als auch chronisch verlaufen. Bei der Anamnese können unter anderem Inappetenz, Gewichtsverlust, Lethargie, Erbrechen, abdominale Umfangsvermehrung und Durchfall festgestellt werden. In seltenen Fällen kann es bei der Katze zu Alopezie (Aydin, Börkü et al. 2003) und beim Hund zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (Bright 1985) kommen. Bei der klinischen Untersuchung fallen häufig abdominaler Palpationsschmerz, Aszites oder ikterisch verfärbte Schleimhäute auf. Zudem gibt es meist bereits Hinweise auf Metastasen.

1.5 Diagnose

Die labordiagnostische Untersuchung liefert ebenfalls keine spezifischen Befunde. Häufig kommt es als Zeichen einer extrahepatischen Cholestase zur Steigerung

der Leberenzymaktivität (alkalische Phosphatase und Alanin-Aminotransferase) und zu einer Bilirubinämie. In einigen Fällen liegt eine Leukozytose, Hyperglykämie, Anämie oder Azotämie vor. Zudem kann es zu einer Erhöhung der Amylase und Lipase im Serum kommen. (Seaman 2004; Kessler 2005)

Röntgenologisch lässt sich in manchen Fällen im kranialen Abdominalbereich eine weichteildichte Masse erkennen. Bedingt durch Peritonitis oder Aszites kann es zu Detailverlust der Bauchhöhlenorgane kommen. Eine ultraschallsonographische Untersuchung des Bauchraumes gab in etwa 75% der Fälle Hinweise auf einen Tumor (Lamb, Simpson et al. 1995). Es stellte sich eine schlecht abzugrenzende hypoechogene Masse zwischen Magen und Duodenum dar. Häufig konnte mit Hilfe einer zytologischen Untersuchung des Ergusses oder Feinnadelaspirates die Diagnose gestellt werden (Bennett, Hahn et al. 2001). Meist steht die endgültige Diagnose jedoch erst nach Probelaaparotomie und histologischer Untersuchung von Biopsiematerial fest.

Als Differentialdiagnosen sind die chronische Pankreatitis und die noduläre Hyperplasie des Pankreas zu nennen. Das Adenokarzinom des Pankreas neigt dazu sehr früh zu metastasieren. Daher ist es oftmals schwierig den Ausgangsort der Neoplasie zu identifizieren.

1.6 Therapie und Prognose

Zum Zeitpunkt der Diagnose hat das Karzinom beim Hund meist schon in andere Organe metastasiert (Steiner 2011). Bei der Katze wurden in 81% der Fälle bei Diagnosestellung bereits metastatische Erkrankungen diagnostiziert (Steiner 2011). Chemotherapie und Strahlentherapie haben bei Patienten mit Pankreaskarzinom wenig Erfolg. In den seltenen Fällen, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasierung festgestellt werden kann, ist die beste Therapie die chirurgische Totalresektion des Tumors. Die Operation ist technisch sehr anspruchsvoll und es erweist sich als schwierig, tumorfreie Ränder zu erzielen. Eine totale Pankreatektomie oder eine Duodenopankreatektomie ist theoretisch möglich, wurde allerdings bei Hunden und Katzen mit natürlich

vorkommender Erkrankung noch nicht beschrieben (Ettinger und Feldman 2010). In einer Studie wird jedoch sehr detailliert über experimentelle Totalresektionen bei Hunden berichtet (Cobb und Merrell 1984). Die postchirurgische Überwachung und Versorgung nach einer totalen Pankreatektomie ist sehr aufwendig. Zudem muss zeitlebens eine Substitutionstherapie der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz erfolgen (Kessler 2005).

Die Prognose bei Adenokarzinom des Pankreas bei Hund und Katze ist als schlecht bis infaust einzustufen. Die meisten Patienten werden vorgestellt, wenn die Erkrankung bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht hat. Auch mit Operation liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei unter 6 Monaten (Nelson 2010).

2 Mausmodelle in der Pankreaseonkologie

Traditionelle molekularbiologische Untersuchungsmethoden wie zellkulturbasierende Assays oder auch Xenotransplantationsmodelle können wichtige Merkmale des PDAC einschließlich der intratumoralen Heterogenität, der Desmoplasie und der spontanen Metastasierung oft nicht berücksichtigen (Mazur und Siveke 2011). Mit der Hilfe von Untersuchungen mit genetisch veränderten Mäusen kann diese Lücke geschlossen werden und sowohl die genetische und als auch die biologische Entstehung des PDAC in einem kliniknahen Modell rekapituliert werden. Dabei zeigen sich bemerkenswerte Übereinstimmungen in der Tumorgenese zwischen Mensch und Maus (Balmain und Harris 2000). Die Möglichkeit, das murine Genom gezielt zu manipulieren, hat die Maus zu einem sehr wichtigen genetischen Modellorganismus für den Menschen gemacht (Resor, Bowen et al. 2001). Letztendlich können Mausmodelle neue diagnostische und therapeutische Perspektiven eröffnen.

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine enorm hohe Rate an genetischen Veränderungen und durch chromosomale Instabilität aus, was unter anderem eine Ursache für die geringe Chemosensitivität dieser Tumorentität darstellen könnte (Mazur und Siveke 2011). Es wurden bereits einige Gene, wie zum Beispiel K-

ras, p53, p16, DPC4 oder BRCA der Pankreastumorgenese zugeordnet (Hahn, Kern et al. 1997; Mazur und Siveke 2011). Derartige Erkenntnisse können eine wichtige Rolle bei der Früherkennung des Pankreaskarzinoms spielen.

Zudem kann ein Gen, das bekanntermaßen mit dem Pankreaskarzinom assoziiert ist, durch sog. „gene targeting“ (Capecchi 1989; Capecchi 1989; Frohman und Martin 1989) in Mäusen gezielt aktiviert oder inaktiviert werden. Anhand des Phänotyps der dabei entstehenden Knock-out-Mäuse lässt sich dann die Auswirkung des Gens auf den Organismus nachvollziehen. Mit der Hilfe der bakteriellen Rekombinase Cre (cyclization recombination) kann dabei sogar der Zeitpunkt der Genveränderung und der Zelltyp genau bestimmt werden (Mazur und Siveke 2011).

Ein wichtiger Durchbruch in diesem Zusammenhang war die Identifizierung und Klassifizierung von sog. Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, die sich im Laufe der Tumورprogression zu einem invasiven Tumor entwickeln (Mazur und Siveke 2011). Nach heutigem Kenntnisstand liegen der Entstehung dieser Vorläuferläsionen unterschiedliche genetische Defekte zugrunde (Ganten 2002). Fundierte Kenntnisse der Histomorphologie dieser Läsionen im PDAC und der damit verbundenen genetischen Veränderungen haben enorme Fortschritte bezüglich des Verstehens genetischer und molekularbiologischer Ereignisse während der Tumorentstehung ermöglicht (Hezel, Kimmelman et al. 2006). Eine der frühesten Keimzellmutationen während der Karzinogenese des PDAC ist die Mutation des K-ras (Kirsten-RAS) Onkogens (Bos 1989). Der Austausch einer einzigen Aminosäure im Codon 12 führt zu einer dauerhaften Aktivierung eines Onkogens. Diese Mutation konnte in 95% der PDAC nachgewiesen werden und zählt damit zu der häufigsten genetischen Veränderung dieser Tumorentität (Delpu, Hanoun et al. 2011). Während der Tumورprogression treten zahlreiche weitere genetische Alterationen auf, die sowohl zur Aktivierung von Onkogenen, als auch zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen können. Im Laufe des letzten Jahrzehnts haben sich Modelle mit genetisch veränderten Mäusen zu einem sehr wertvollen Hilfsmittel entwickelt, um die Rolle zentraler Gene und Signalwege während der Karzinogenese des PDAC zu verstehen (Mazur und Siveke 2011).

3 Pankreaskarzinom beim Menschen

Das Pankreaskarzinom macht in Deutschland etwa 3% aller Krebserkrankungen aus. Es ist damit im Vergleich zur häufigsten Neoplasie der Frau, dem Mammakarzinom mit 27,8% oder der häufigsten Krebserkrankung des Mannes, dem Prostatakarzinom mit 25,4% relativ selten. (Kaatsch, Spix et al. 2012)

Trotz der Seltenheit dieses Karzinoms ist es Deutschland und auch in den USA die vierthäufigste krebbedingte Todesursache (ACS 2011; Kaatsch, Spix et al. 2012). Die hohe Sterblichkeit hängt unter anderem mit dem aggressiven Wachstumsverhalten und mit der frühzeitigen Metastasenbildung dieser Tumorentität zusammen. Zudem verursacht das Pankreaskarzinom meist lange Zeit keine Beschwerden beim Patienten und wird dadurch erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (DiMagno, Reber et al. 1999; Kaatsch, Spix et al. 2012). Zu diesem Zeitpunkt ist eine kurative Therapie leider oft nicht mehr möglich (Adler, Seufferlein et al. 2007; ACS 2011).

3.1 Ätiologie

Die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist trotz intensiver Forschung noch weitgehend ungeklärt. Es existieren allerdings einige Risikofaktoren, die mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert sind.

Ein bedeutender Risikofaktor ist Zigarettenkonsum. Pankreaskarzinome können durch tabakspezifische N-Nitrosamine induziert werden (Rivenson, Hoffmann et al. 1988). Studien konnten belegen, dass Raucher ein doppelt so hohes Risiko haben ein Pankreaskarzinom zu entwickeln wie Nicht-Raucher (Muscat, Stellman et al. 1997; Lowenfels und Maisonneuve 2004). Einige Forscher konnten eine Verbindung zwischen dem Konsum von gegrilltem Fleisch und Fisch und einem erhöhtem Erkrankungsrisiko herstellen (DiMagno, Reber et al. 1999). Umweltfaktoren, wie Pestizid- oder Dichlordiphenyltrichlorethan(DDT)-Exposition erhöhen ebenfalls das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Garabrant,

Held et al. 1992; Ji, Silverman et al. 2001). Zudem soll Adipositas die Entstehung von Karzinomen des exokrinen Pankreas begünstigen. Eine Metaanalyse konnte ein ansteigendes Risiko mit zunehmenden Body Mass Index nachweisen (Berrington de Gonzalez, Sweetland et al. 2003).

Die chronische Pankreatitis ist unabhängig von ihrer Ätiologie ebenfalls ein gesicherter Risikofaktor für das Pankreaskarzinom (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1993). Auch der Diabetes mellitus ist eine Vorerkrankung, die mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert ist. Vor allem eine langjährige Erkrankung führt zu einem erhöhten Risiko (Chari, Leibson et al. 2005). Eine kanadische Studie konnte aufzeigen, dass ein Diabetes mellitus etwa 3-mal häufiger bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu den Kontrollgruppen vorkam (Ekoe, Ghadirian et al. 1992).

Alkoholmissbrauch gilt als ein gesicherter Risikofaktor für die chronische Pankreatitis. Damit besteht eine indirekte Verbindung zum Pankreaskarzinom. Ein direkter Zusammenhang mit der Erkrankung am Pankreaskarzinom konnte jedoch noch nicht festgestellt werden (Birth 2010).

Bei der Ätiologie des Pankreaskarzinoms spielen neben Umweltfaktoren, Lebensgewohnheiten und Vorerkrankungen ebenfalls einige hereditäre Erkrankungen eine Rolle. Etwa 5 bis 10% der Patienten berichten von einer familiären Vorgeschichte bezüglich eines Pankreaskarzinoms. Zudem sind verschiedene genetisch bedingte Syndrome, wie zum die hereditäre Pankreatitis, das hereditäre Mammakarzinom, das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Lynch-Syndrom mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko assoziiert. (Simon und Printz 2001; Shi, Hruban et al. 2009)

3.2 Pathophysiologie

Pankreaskarzinome sind zu etwa 95% im exokrinen Pankreas lokalisiert (Seeber 2003). Davon gehen wiederum 80% vom Gangepithel des Pankreas aus (Seeber 2003). Aus diesem Grund wird häufig auch vom duktalem Adenokarzinom des Pankreas gesprochen (PDAC). Zudem werden Zystadenokarzinome, adenosqua-

möse Karzinome, muzinöse Karzinome und Riesenzellkarzinome beobachtet. Das Azinuszellkarzinom kommt mit etwa 2% beim Menschen sehr selten vor (Seeber 2003).

Im Rahmen der Tumorprogression kommt es zu einer sehr ausgeprägten Desmoplasie und zu einer lymphozytären Begleitreaktion (Krams 2010). Typisch für das Pankreaskarzinom sind neuroplastische und neuropathischen Veränderungen, wie Neuritis, Zunahme der Nervendichte, neurale Hypertrophie und neurale Invasion von Karzinomzellen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die neurale Invasion führt zu einer frühzeitigen Infiltration retroperitonealer Strukturen und zur weiteren Metastasierung (siehe unten).

3.3 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom zählt mit etwa 15.000 Neuerkrankungen im Jahr zu den 10 häufigsten Tumorarten in Deutschland (Kaatsch, Spix et al. 2012). In den USA liegt die geschätzte Inzidenzrate 2011 bei 3% (ACS 2011). Dabei ist die Zahl der Neuerkrankungen bei Männern tendenziell höher als bei Frauen. Trotz der sehr niedrigen Inzidenz ist das Pankreaskarzinom sowohl in Deutschland als auch in den USA die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache. Die Mortalität liegt bei etwa 6,5% (ACS 2011; Kaatsch, Spix et al. 2012). Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit dem Alter deutlich zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 70 und für Frauen bei 76 Jahren (Kaatsch, Spix et al. 2012). Im allgemeinen erkrankt die Bevölkerung in der Stadt eher als auf dem Land (Lillemoe, Yeo et al. 2000).

3.4 Symptome

Die Symptomatik des Pankreaskarzinoms ist meist sehr unspezifisch und von der Lokalisation des Tumors abhängig. Zu den Symptomen gehören paraneoplas-

tische Syndrome wie zum Beispiel Hyperthermie, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Anorexie, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit sowie Steatorrhoe und Dyspepsie (Fazal und Saif 2007). Bei Karzinomen mit einer Lokalisation im Kopfbereich des Pankreas tritt meist ein schmerzloser Verschlussikterus auf. Ist dabei die gestaute Gallenbase durch die Bauchdecke hindurch palpierbar, spricht man vom Courvoisier-Zeichen (Krams 2010). Karzinome im Korpus- und Schwanzbereich des Pankreas führen vermehrt zu Schmerzen im Oberbauch und zu unspezifischen Rückenschmerzen. Zudem kann es im Rahmen der Erkrankung zu Aszites und einem erhöhten Thromboserisiko kommen. Ein Bauchhöhlenerguss gibt Hinweis auf eine Peritonealkarzinose oder Lebermetastasierung. (Seeber 2003)

3.5 Diagnose

Trotz großer Bemühungen seitens der Forschung existiert bis heute kein effektives und wenig invasives Screening-Programm zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms (Shin und Canto 2012). Zudem verläuft die Erkrankung sehr lange asymptomatisch, sodass sie sich zum Zeitpunkt der Beschwerden meist schon im fortgeschrittenen Stadium befindet. Nur in 8% der Fälle kann die Diagnose in einem frühen Stadium gestellt werden (ACS 2011).

Zur Orientierung und um die Verdachtsdiagnose aufgrund der klinischen Untersuchung zu bestätigen, wird zunächst eine Oberbauchsonographie durchgeführt. Eine Computertomographie (CT) gibt Auskunft über Lage und Ausbreitung des Tumors, sowie über die Beteiligung des umliegenden Gewebes. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf eine etwaige Gefäßinfiltration des Primärtumors gelegt. Bei bestehendem Verschlussikterus erfolgt eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP), im Rahmen derer auch eine Biopsie entnommen und zur Entlastung der Cholestase ein Stent platziert werden kann. Weiterhin gehören die Doppel-Spiral-Computertomographie, Endoskopie, Magnetresonanztomographie (MRT), Magnetresonanztomographie, Magnetresonanztomographie und die Endosonographie mit der Option einer Feinnadelbiopsie zu den diagnostischen Mitteln beim Pankreaskarzinom. Neben

der histologischen und zytologischen Diagnostik kann eine labormedizinische Untersuchung des Blutes auf die Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen) und CA19-9 (Carbohydrate-Antigen 19-9) durchgeführt werden. Die Sensitivität und die Spezifität von CA19-9 liegen etwa bei 70 bis 90%. (Seeber 2003)

3.6 Therapie

Die Wahl der Behandlungsmethoden wird zum Teil kontrovers diskutiert und ist von Stadium und Lokalisation des Tumors sowie vom Gesundheitszustand des Patienten abhängig.

Die vollständige Tumoresektion (R0-Resektion) ist die einzige Möglichkeit einer kurativen Behandlung des Pankreaskarzinoms (Vincent, Herman et al. 2011). Eine Pankreatektomie ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung allerdings nur noch bei 10 bis 15% der Patienten möglich (Hilbig und Oettle 2010). Der Tumor gilt als resektabel, wenn er lokal begrenzt ist bzw. keine arterielle Gefäßinfiltration vorliegt und zudem keine Fernmetastasen nachzuweisen sind (Friess, Kleeff et al. 2003). Bei Pankreaskopftumoren wird die Kausch-Whipple-Operation heutzutage immer häufiger pyloruserhaltend durchgeführt. Bei etwa einem Drittel der Pankreaskarzinome ist der Tumor im Körper- und Schwanzbereich des Pankreas lokalisiert (Volker Keim, Ernst Klar et al. 2009). Unter diesen Umständen wird meist eine Pankreaslinksresektion durchgeführt. Einige Studien belegen, dass die postoperative Mortalität stark von der Erfahrung des Operateurs und seines Teams abhängig ist. Sie liegt bei Kliniken mit einer geringen Anzahl von Operationen pro Jahr bei über 10% und in großen medizinischen Zentren bei unter 5% (Friess, Kleeff et al. 2003).

Trotz des aktuellen Trends in Richtung einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabin existiert keine einheitliche Meinung bezüglich der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms (Hilbig und Oettle 2010). Chemotherapie kann unterstützend zur chirurgischen Behandlung sowie bei Metastasen, lokal fortgeschrittenen oder inoperablen Tumoren eingesetzt werden. Zahlreiche

Studien haben vor allem zur adjuvanten Therapie Gemcitabin als Standardtherapie etabliert, da mit Hilfe dieser Behandlung eine 1-Jahr-Überlebensrate von 18 bis 20% zu erzielen war. Der Einsatz von 5-Fluorouracil (5-FU) oder Kombinationstherapien von Gemcitabin mit anderen Chemotherapeutika ist ebenfalls möglich. Eine Kombination von Gemcitabin mit dem Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib kann das mediane Überleben um bis zu 25% erhöhen. (Adler, Seufferlein et al. 2007; Oettle, Post et al. 2007)

Der Einfluss von Radio- und Chemoradiotherapie auf das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom wird kontrovers diskutiert. Bis zum heutigen Zeitpunkt kann der Einsatz nur bedingt empfohlen werden. (Warszawski, Link et al. 1999; Adler, Seufferlein et al. 2007; Reni 2012)

Etwa 80% der Patienten leiden an milden bis starken Schmerzen, daher ist eine effektive Schmerztherapie von großer Bedeutung (Fazal und Saif 2007). Dabei gelten die allgemeinen Regeln der Tumorschmerztherapie, die Überlegenheit eines bestimmten Analgetikums konnte jedoch bis jetzt nicht nachgewiesen werden (Adler, Seufferlein et al. 2007). Die Applikation kann sowohl enteral als auch parenteral erfolgen. Auch invasive neuroablative Therapieverfahren, wie zum Beispiel die Coeliacusblockade (Staats, Hekmat et al. 2001) oder die Splanchniektomie (Lillemoe, Cameron et al. 1993) werden zur Schmerzlinderung eingesetzt.

Ergänzend dazu spielt neben der Thromboseprophylaxe und der Enzym- und Hormonsubstitution nach Pankreatektomie (Vincent, Herman et al. 2011), die Ernährungstherapie bei Pankreaskarzinompatienten eine wichtige Rolle (Wigmore, Plester et al. 1997; Pelzer, Arnold et al. 2010). Eine der erschreckendsten Eigenschaften des Pankreaskarzinoms ist der progressive Gewichtsverlust (Falconer, Fearon et al. 1995). Eine therapie- und tumorbedingte Kachexie wirkt sich negativ auf Prognose und Lebensqualität der Patienten aus (Arends, Zürcher et al. 2003). Aus diesem Grund ist auf eine energetisch ausreichende Energiezufuhr zu achten. Bei Bedarf können appetitanregende Medikamente wie Ibuprofen, Steroide oder Cannabinoide eingesetzt werden (Adler, Seufferlein et al. 2007).

3.7 Prognose

Die Fünfjahresüberlebensrate schwankt je nach Tumorstadium zwischen 2 und 23% (ACS 2011). Bei einer durchschnittlichen Fünfjahresüberlebensrate von 6% (ACS 2011) und einer mittleren Überlebenszeit von 4 bis 6 Monaten (Seeber 2003) nach der Diagnosestellung gehört das Pankreaskarzinom zu den Erkrankungen mit der schlechtesten Prognose unter allen Krebserkrankungen. Die mittlere Überlebenszeit verlängert sich nach einer Resektion auf 11 bis 25 Monate (Hilbig und Oettle 2010).

4 Pankreatische Sternzellen in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms

Die ersten Studien an pankreatischen Sternzellen basieren auf den Erfahrungen der Erforschung analoger Zellen in der Leber. Die hepatischen Sternzellen wurden bereits 1876 von Karl Wilhelm von Kupffer beschrieben (Geerts 2001). Sie dienen der Speicherung von Retinol, sowie der Regeneration der Leber durch Produktion von extrazellulärer Matrix (Friedman und Roll 1987; Geerts 2001). Pankreatische Sternzellen wurden erstmals 1982 als Retinol speichernde Zellen (Watari, Hotta et al. 1982) und 1997 als periazinär lokalisierte fibroblastenähnliche Zellen im Pankreas entdeckt (Saotome, Inoue et al. 1997). 1998 gelang es, diese zu isolieren und zur genaueren Erforschung in Kultur zu nehmen (Apte, Haber et al. 1998). Im normalen Pankreasgewebe sind die PSC v.a. periazinär und interlobulär lokalisiert und besitzen einen intrazytoplasmatischen Fett- und Retinolspeicher. *In vitro* können sich diese fibroblastenähnlichen Primärzellen in myofibroblastenähnliche Zellen transformieren (Bachem, Schneider et al. 1998).

Im gesunden Gewebe existieren die PSC nur in ihrem inaktiven Zustand. Sie können sowohl autokrin als auch parakrin unter dem Einfluss von zahlreichen Wachstumsfaktoren und Cytokinen, Ethanol, Endotoxinen oder oxidativem Stress aktiviert werden. Wachstumsfaktoren wie TGF-beta oder PDGF können z.B. von PCC selbst ausgeschüttet werden. Im aktiven Zustand sezernieren die PSC über-

mäßige Mengen an extrazellulärer Matrix, insbesondere Fibronectin, Kollagen Typ I, III und Laminin. Es wird davon ausgegangen, dass dauerhaft aktivierte PSC für die desmoplastischen Reaktionen im Pankreaskarzinom verantwortlich sind und damit eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielen. Die übermäßige Bindegewebsreaktion im PDAC ist im Vergleich zu anderen epithelialen Tumoren sehr prominent. Zunächst wurde das kollagen- und fibronectinhaltige desmoplastische Gewebe als Barriere gegen die Tumorerinvasion angesehen. Neue Studien haben jedoch gezeigt, dass die desmoplastischen Reaktionen eine zentrale Rolle bei Wachstum und Progression des Pankreaskarzinoms spielen. Die extrazelluläre Matrix (ECM) bietet dem Tumor als Stützgerüst und Reservoir für lösliche Mitogene eine optimale Mikroumgebung. Aktivierte PSC gelten jedoch nicht nur als Hauptproduzenten der ECM, sondern setzen selbst eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren frei. Diese Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel NGF, PDGF und PGF haben wiederum Einfluss auf Neuroplastizität, Angiogenese und Tumorzellproliferation und tragen damit zur Tumorprogression, Invasion und Metastasierung bei. (Erkan, Kleeff et al. 2007; Vonlaufen, Phillips et al. 2008; Duner, Lopatko Lindman et al. 2010; Erkan, Adler et al. 2012)

Die Invasion der Nerven im PDAC durch die PCC findet vor allem in bindegewebsreichen Regionen des Pankreas statt (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Als Hauptproduzenten von fibronectinhaltigem desmoplastischem Gewebe im PDAC könnten die PSC in diesem Zusammenhang auch als Bindeglied zwischen den Karzinomzellen und dem Nervengewebe eine entscheidende Rolle einnehmen.

5 Neurale Invasion im Pankreaskarzinom

Die neurale Invasion ist ein besonderer Metastasierungsweg beim Pankreaskarzinom. Die Prävalenz der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom liegt laut verschiedener Studien bei bis zu 100% (Matsuda und Nimura 1983; Nagakawa, Kayahara et al. 1992; Kayahara, Nagakawa et al. 1995; Takahashi, Ishikura et al. 1997; Meyer, Jurowich et al. 2000). Obwohl die neurale Invasion

charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist, konnte sie auch in anderen Tumoren wie zum Beispiel dem Magenkarzinom, Rektumkarzinom oder Ösophaguskarzinom nachgewiesen werden. (Liu und Lu 2002)

Die Karzinomzellinvasion von Nerven wurde bereits Anfang des 19. Jahrhunderts von Anatomen und Pathologen beschrieben (Cruveilhier 1835). Jentzer konnte 1930 eine Erklärung für die Entstehung der neuralen Invasion finden (Jentzer 1930). Er beobachtete erstmals, dass sich Krebszellen neben den Blut- und Lymphgefäßen die Nerven als zusätzlichen Weg für die Ausbreitung zunutze machen. Er bezeichnete dieses Phänomen als Neurotropismus. Dieses Erkenntnis ist die Grundlage für aktuelle Studien, die beweisen, dass die neurale Invasion insbesondere im Pankreaskarzinom mit Tumorprogression, Lokalrezidiven und neuropathischen Schmerzen assoziiert ist. (Demir, Ceyhan et al. 2010)

Zahlreiche japanische Studien (Nakao, Harada et al. 1996; Yi, Miwa et al. 2003; Makino, Kitagawa et al. 2008) konnten eine mögliche Erklärung für die hohe Inzidenz der neuralen Invasion gerade bei Pankreastumoren finden: Die anatomische Lokalisation des Pankreas scheint eine der Grundlagen für die Ausbreitung entlang der Nerven zu sein. Das Pankreas liegt retroperitoneal im kranialen Abdomen. Seine anatomische Lokalisation zeichnet sich durch die Nähe zu zahlreichen Nervengeflechten wie zum Beispiel dem Plexus coeliacus, lienalis, mesentericus oder hepaticus aus. Klinisch-pathologische Untersuchungen konnten aufzeigen, dass die Invasion dieser extrapankreatischen Nervengeflechte von der Lokalisation des Tumors im Kopf-, Körper- oder Schwanzbereich des Pankreas abhängt (Nakao, Harada et al. 1996).

Bockman et al. leisteten mit der Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Pankreaskarzinomgeweben einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des Mechanismus der neuralen Invasion. Sie stellten fest, dass die Interaktion zwischen PCC und Nerven nicht nur zur perineuralen Invasion sondern auch zur Zerstörung der Nervenarchitektur führt. Durch die Schädigung des Perineuriums sind die Nervenfasern biologisch aktiven Substanzen der PCC und der Außenwelt schutzlos ausgeliefert. Es kommt zur Induktion nervaler Impulse, die wiederum zusammen mit der Zerstörung der nervalen Integrität für die beim Pankreaskarzinom häufig vorkommenden abdominalen Schmerzen verantwortlich sein könnten. (Bockman, Buchler et al. 1994)

Die neurale Invasion im Pankreaskarzinom basiert auf der Interaktion zwischen PCC und den Nerven. Es existieren zahlreiche Erklärungsansätze für die Affinität der PCC zu den Nerven (Liu und Lu 2002). Ein Ansatz erklärt die Invasion der PCC entlang des perineuralen Raums damit, dass dieser den Weg des geringsten Widerstandes darstellt. Eine andere These geht davon aus, dass die Invasion der PCC ursprünglich von den Blut- und Lymphgefäßen des perineuralen Feldes ausgeht. Diese stehen immer in enger Verbindung mit den Nerven und bieten den PCC zudem eine nährstoff- und sauerstoffreiche Umgebung. Ein weiterer Erklärungsansatz führt die spezielle Anziehung zwischen PCC und den Nerven auf die Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen durch neurale und perineurale Zellen zurück.

Basierend auf diesen Erklärungsansätzen widmeten sich die Forscher unter anderem der Identifizierung von potentiellen Mediatoren für die Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom. Hierfür untersuchten sie verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Chemokine oder andere mit Nerven assoziierte Moleküle. Es zeigte sich, dass sowohl der Wachstumsfaktor TGF- α als auch NGF die Nerven für die PCC attraktiv macht (Bockman, Buchler et al. 1994; Zhu, Friess et al. 1999). Zudem konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Expression von NGF und der perineuralen Invasion sowie der Schwere der abdominalen Schmerzen nachgewiesen werden (Zhu, Friess et al. 1999). CX3CR1, ein Rezeptor des neuronalen Chemokins Fraktalkin, konnte ebenfalls als ein Mediator der neuralen Invasion ausfindig gemacht werden (Marchesi, Piemonti et al. 2008). Weiteren Studien befassten sich mit der Erforschung zahlreicher mit Nerven assoziierter Moleküle. Unter anderem konnten Artemin und GDNF mit einer erhöhten Invasivität der PCC in Verbindung gebracht werden (Ceyhan, Giese et al. 2006; Gil, Cavel et al. 2010).

In einer umfangreichen pathomorphologischen Studie untersuchte Kayahara den Mechanismus der Ausbreitung der PCC entlang der Nerven im Rahmen der neuralen Invasion. Er beschrieb 5 verschiedene Ausbreitungsmuster: direkte neurale Invasion, kontinuierliches Wachstum der PCC entlang der perineuralen Raumes, Aufteilung der Tumormasse entlang der Nerven aufzweigungen, Ausbildung eines Kegels aus PCC und direkte Invasion regionärer Lymphknoten. In 50% der Fälle zeigte sich entfernt vom ursprünglichen Tumor eine extratumorale perineurale Invasion genannt „nex“. Kayahara gab zu bedenken, dass die neurale Invasion

zwar die wichtigste aber nicht die einzige Art der Ausbreitung von PCC ist. (Kayahara, Nakagawara et al. 2007)

Eine weitere pathomorphologische Studie zeigte, dass es innerhalb des Pankreaskarzinoms zu einer Hypertrophie und Dichtezunahme der Nerven kommt. Diese neuroplastischen Veränderungen führten wiederum zu einer Steigerung der neuralen Invasion (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Hier konnte eine deutliche Korrelation zwischen neuroplastischen Veränderungen und abdominalen Schmerzen festgestellt werden. Patienten mit einer Größen- und Dichtezunahme der Nerven, sowie mit neuraler Invasion litten häufiger und länger an starken abdominalen Schmerzen. Man geht davon aus, dass die für das Pankreaskarzinom charakteristischen Schmerzen durch direkte Schädigung der Nerven verursacht werden und spricht deshalb von „neuropathischen“ Schmerzen. (Ceyhan, Bergmann et al. 2009)

In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe gelang es, die Interaktionen zwischen PCC und Nerven mittels eines neuen 3D-Migrationsassays nachzuahmen. Die starke Affinität von PCC zu Nerven konnte hier bestätigt und *in vitro* erfolgreich reproduziert werden. Zudem fielen deutliche morphologische und funktionelle Veränderungen der PCC während ihrer Migration zu den neuronalen Strukturen auf. Sie bildeten Kolonien und gruppierten sich um die Nerven herum. Dabei war die Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen in Richtung der Neuriten besonders auffällig. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass die Krebszellen, schon bevor sie in direkten Kontakt mit den Nerven treten, mit diesen kommunizieren. (Ceyhan, Demir et al. 2008)

Bisher nicht publizierte Studien der Arbeitsgruppe Ceyhan zeigen, dass die neurale Invasion im Pankreaskarzinom nicht nur durch die Migration der PCC zu den neuronalen Strukturen charakterisiert ist, sondern sich erstaunlicherweise auch durch die zielgerichtete Migration der humanen Schwannschen Zellen (hSC) zu den PCC auszeichnet. Die Migration der hSC zu den PCC erfolgte zwar mit einer vergleichsweise geringen Geschwindigkeit, dafür aber sehr viel gerichteter als die Migration der PCC zu den neuronalen Strukturen. Die Entdeckung der Anziehung zwischen den PCC und der glialen Komponente der neuronalen Strukturen lieferte einen neuen Denkansatz zur Erforschung der Mechanismen der neuralen Invasion. Es stellt sich die Frage, ob die Nerven durch ihre Migration zu den PCC die neurale Invasion induzieren bzw. vielleicht sogar erst ermöglichen.

Alleine Swanson befasste sich in diesem Zusammenhang bereits genauer mit der Anziehung zwischen PCC und hSC im Pankreaskarzinom. Im Rahmen der Untersuchung konnte sowohl MUC1 als auch MAG im Pankreaskarzinom nachgewiesen werden. MUC1 ist ein transmembranöses Mucin mit adhäsiven Eigenschaften und ist im Pankreaskarzinom überexprimiert. Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) ist ein membrangebundenes Protein, das vor allem auf Gliazellen exprimiert wird und die Bindung zwischen Myelin und Neuronen vermittelt. Mit der Hilfe von zahlreichen molekularbiologischen Methoden konnte eine spezifische Bindung von MAG an MUC1 aufgezeigt werden. Die Stärke der Adhäsion von hSC und PCC korrelierte interessanterweise mit der Expression von MAG und MUC1. Diese Tatsache gibt Grund zu der Annahme, dass MUC1 einen Rezeptor für MAG auf den hSC darstellt und damit zur Vermittlung der Adhäsion der beiden Zellarten beiträgt. Damit könnte die Interaktion zwischen MUC1 und MAG eine Rolle bei der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom spielen. Die Blockade von MAG auf den hSC konnte die Adhäsion der PCC allerdings nicht vollständig aufheben. Aufgrund dessen ist die Erforschung weiterer Oberflächenmoleküle, welche die Adhäsion von PCC an den hSC vermitteln, von großem Interesse. (Swanson, McDermott et al. 2007)

6 Adhäsionsmoleküle auf hSC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM untersucht. Beide Oberflächenmoleküle konnten bereits auf hSC nachgewiesen werden (Fransen, Van Camp et al. 1997; Grumet 1997).

6.1 Schwannsche Zellen

Die Schwannschen Zellen gehören zu den Gliazellen. Sie umhüllen die Axone des

peripheren Nervensystems und bilden eine sogenannte Myelinschicht aus verschiedenen Lipiden, sowie Phosphaten und Cholesterin. Im zentralen Nervensystem übernehmen diese Funktion die Oligodendrozyten. Man unterscheidet marklose und markhaltige Nervenfasern. Während der Genese von markhaltigen Nervenfasern wird das Axon von der Schwannschen Zelle mehrfach mit einer sogenannten Myelinscheide umwickelt. Unter marklosen Nervenfasern versteht man dagegen Axone, die nur einfach von der Schwannschen Zelle umgeben werden. Schwannsche Zellen haben nicht nur Hüll- und Stützfunktion, sondern dienen ebenfalls der metabolischen Unterstützung der Neuronen. (Engelhardt 2009)

6.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules/CAMs) sind Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche verschiedener Zellen exprimiert werden. CAMs können homophile Bindungen mit sich selbst, heterophile Bindungen mit anderen Oberflächenmolekülen, sowie Bindungen mit der extrazellulären Matrix eingehen (Aplin, Howe et al. 1998; Schmid und Maness 2008). Man unterscheidet 4 verschiedene Hauptgruppen von CAMs: die Integrine, die Selektine, die Cadherine und die Immunglobulin-Superfamilie (Aplin, Howe et al. 1998). Die Integrine erfüllen viele verschiedene Aufgaben. Sie sind unter anderem an der Wundheilung, der Immunabwehr und der Migration von Zellen während der Embryogenese beteiligt (Elangbam, Qualls et al. 1997; Humphries 2000). Selektine werden auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten exprimiert (Elangbam, Qualls et al. 1997). Die Erhaltung adulter Gewebestrukturen ist hauptsächlich von der Funktionalität der Cadherine abhängig (Elangbam, Qualls et al. 1997; Angst, Marozzi et al. 2001). CAMs der Immunglobulin-Superfamilie sind komplexe Transmembranmoleküle, die sich durch eine variable Anzahl von extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, und durch eine variable Anzahl an Fibronectin-TypIII-ähnlichen Wiederholungen auszeichnen (Crossin und Krushel 2000). Mitglieder der Immunglobulin-Super-

familie werden auf einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und sind an vielen verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt (Aplin, Howe et al. 1998).

CAMs spielen eine wichtige Rolle, sowohl bei Zell-Zell-, als auch Zell-Matrix-Kontakten (Aplin, Howe et al. 1998). Sie sind unter anderem an Entzündungsreaktionen und neoplastischen Erkrankungen beteiligt. Studien haben ergeben, dass Veränderungen des Expressionsmusters von CAMs mit Metastasierung und Progression maligner Tumoren assoziiert sind. (Cavallaro und Christofori 2001; Cavallaro und Christofori 2004)

6.2.1 NrCAM

NrCAM (Neuroglia-CAM-related CAM), auch Bravo genannt, wurde erstmals im Nervensystem des Huhns identifiziert und 1991 von Grumet genauer beschrieben (Grumet, Mauro et al. 1991). NrCAM gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und zusammen mit L1, Ch-L1 (close homolog of L1) und Neurofaszin zu der Unterfamilie der L1-Zelladhäsionsmoleküle (Schmid und Maness 2008). Es besteht aus einer sehr großen extrazellulären Untereinheit mit 6 immunglobulin-ähnlichen und 5 fibronectinähnlichen Domänen, einer transmembranösen und einer kurzen zytoplasmatischen Untereinheit (Abb.1). Die zytoplasmatische Untereinheit kann an Ankyrin oder an andere Proteine, die Teil der transmembranösen Signalkette sind, binden (Grumet 1997). Die heterodimere Struktur von NrCAM setzt sich aus einer α -Kette mit einem Gewicht von 130 bis 140 kDa und einer β -Kette mit einem Gewicht von 60 bis 80 kDa zusammen (Kayyem, Roman et al. 1992).

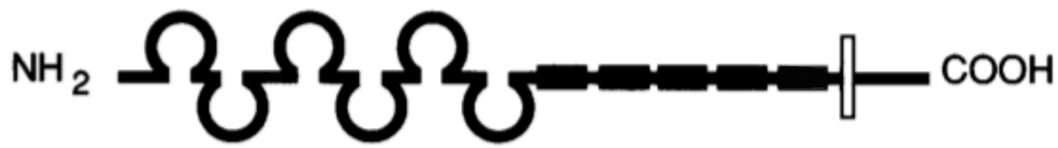


Abbildung 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von NrCAM: die Schleifen repräsentieren die immunglobulinähnlichen Domänen, die Rechtecke repräsentieren die fibronectinähnlichen Domänen, die transmembranöse Untereinheit wird durch einen senkrechten Balken dargestellt (Grumet, Mauro et al. 1991)

NrCAM wurde zunächst nur im Nervensystem nachgewiesen. Dort wird es auf zahlreichen Zellen, wie zum Beispiel auf Schwannschen Zellen, Neuronen oder Zellen der Bodenplatte exprimiert. Auch im Auge konnte NrCAM in der Axonschicht der Retina und auf den Müllerschen Zellen nachgewiesen werden. (Grumet 1997)

Über die Funktionen von NrCAM ist noch relativ wenig bekannt. Es kann sowohl heterophile als auch relativ schwache homophile Bindungen eingehen. Dabei vermitteln homophile Mechanismen Interaktionen zwischen Neuronen und heterophile Mechanismen kalziumabhängige Bindungen zwischen Neuronen und anderen Zellarten (Mauro, Krushel et al. 1992). Auf Schwannschen Zellen exprimiertes NrCAM bindet zum Beispiel an Axonin-1 auf Neuronen und vermittelt den Kontakt zwischen diesen beiden Zellarten. Neben seiner Funktion als Ligand kann NrCAM auch als Rezeptor für Neurofascin, Contactin oder Protein Tyrosin Phosphatase β dienen. Damit ist das Oberflächenmolekül unter anderem am Auswachsen von Neuriten beteiligt. (Grumet 1997)

In den letzten Jahren wurde NrCAM vermehrt mit tumorösen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine Studie zur Tumorgenese des malignen Melanoms und des Kolonkarzinoms bewies, dass NrCAM ein Zielgen des β -Catenin Signalweges ist. Die Expression von NrCAM konnte in diesem Zusammenhang mit induziertem Zellwachstum, verbesserter Motilität, Zelltransformation und einem raschen Tumorwachstum assoziiert werden. NrCAM konnte sowohl im malignen Melanom als auch im Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Ein Nachweis in Melanozyten oder in unverändertem Kolongewebe war dagegen nicht möglich. (Conacci-Sorrell, Ben-Yedidia et al. 2002)

Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass NrCAM wahrscheinlich sowohl an

physiologischen als auch an pathologischen Prozessen im Pankreas beteiligt ist. Die Expression von NrCAM wurde anhand von Gewebeproben 11 verschiedener Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas untersucht (Dhodapkar, Friedlander et al. 2001). Im Rahmen dieser Studie konnte NrCAM im gesunden Gewebe vor allem in den Azinuszellen aber auch in den Gangzellen nachgewiesen werden. Die Expression im Karzinomgewebe war sehr heterogen und abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors. Tendenziell war Expression in gut differenzierten Tumoren stärker als im Normalgewebe. In wenig differenzierten Tumoren konnte NrCAM dagegen meist nicht nachgewiesen werden. (Dhodapkar, Friedlander et al. 2001)

6.2.2 L1CAM

L1CAM ist eine transmembranöses Glykoprotein, das ursprünglich im Gehirn von verschiedenen Tierarten, wie zum Beispiel der Maus (Rathjen und Schachner 1984) und später auch im menschlichen Gehirn (Hlavin und Lemmon 1991) beschrieben wurde. Der strukturelle Aufbau von L1CAM ähnelt dem von NrCAM (Kayyem, Roman et al. 1992). L1CAM gehört ebenfalls zu der Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus 3 verschiedenen Untereinheiten. Die extrazelluläre Untereinheit aus 6 immunglobulinähnlichen und 5 fibronectinähnlichen Domänen macht den größten Anteil aus. Sie wird durch die transmembranöse Untereinheit mit der stark konservierten zytoplasmatischen Untereinheit verbunden (Brummendorf und Rathjen 1993). Durch alternatives Spleißen und posttranslationäre proteolytische Spaltung können zahlreiche Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls entstehen (Faissner, Teplow et al. 1985; Takeda, Asou et al. 1996). Dabei werden Fragmente mit einem unterschiedlichen Molekulargewicht von 40 bis zu etwa 200 kDa erzeugt (Faissner, Teplow et al. 1985).

L1CAM wird hauptsächlich auf Neuronen und Schwannschen Zellen exprimiert (Fransen, Van Camp et al. 1997) und konnte zudem auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen (Kowitz, Kadmon et al. 1992) und auf Endothelzellen (Debiec, Christensen et al. 1998) nachgewiesen werden. Über die extrazelluläre Untereinheit kann L1CAM sowohl homophile als auch heterophile Bindungen mit

anderen CAMs, wie zum Beispiel den Integrinen eingehen (Mechtersheimer, Gutwein et al. 2001). Als neuronales Zelladhäsionsmolekül spielt L1CAM eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Es vermittelt unter anderem die Zelladhäsion zwischen Neuronen und beeinflusst die Migration, Faszikulation und Myelinisierung von Nervenzellen. (Moos, Tacke et al. 1988)

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass L1CAM bei malignen Erkrankungen hochreguliert wird. Die vermehrte Expression von L1CAM wird unter anderem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Miyahara, Tanaka et al. 2001), Magenkarzinom (Kodera, Nakanishi et al. 2009), Kolonkarzinom (Gavert, Sheffer et al. 2007), Uteruskarzinom, Ovarialkarzinom (Fogel, Gutwein et al. 2003) und beim malignen Melanom (Thies, Schachner et al. 2002) mit Tumorprogression oder Metastasierung in Verbindung gebracht.

Aktuelle Untersuchungen am PDAC konnten eine Korrelation zwischen vermehrter Expression von L1CAM und schlechter Prognose herstellen: In einer Studie wurden 107 Patienten mit PDAC auf die Expression von L1CAM hin untersucht (Tsutsumi, Morohashi et al. 2011). In 21,5% der Fälle konnte L1CAM immunhistochemisch im Zytoplasma der Karzinomzellen nachgewiesen werden (Tsutsumi, Morohashi et al. 2011). Dabei war die Expression an der invasiven Front des Tumors besonders prominent. Zudem konnte die Expression von L1CAM mit dem histologischen Grad des Tumors, Lymphknotenbeteiligung sowie mit Fernmetastasen assoziiert werden. Eine Verbindung zu lymphatischer, venöser oder perineuraler Invasion im Tumor konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Tsutsumi, Morohashi et al. 2011). Eine andere Studie wies an 94 Patienten mit PDAC in 36,2% der Fälle eine erhöhte Expression von L1CAM nach (Ben, Wang et al. 2010). Die immunhistochemische Analyse ergab eine Immunoreaktivität des Zytoplasmas von Tumor- und auch Nervenzellen. Interessanterweise war im Rahmen dieser Untersuchung die erhöhte Expression von L1CAM mit vaskulärer und perineuraler Invasion sowie mit Lymphknotenbeteiligung, Schmerz und kürzerer Überlebenszeit der Patienten unmittelbar assoziiert (Ben, Wang et al. 2010).

III ZIEL DER ARBEIT

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der hSC in der neuralen Karzinomzellinvasion im Pankreaskarzinom genauer zu charakterisieren. Die Ausbreitung der PCC entlang der Nerven im Rahmen der neuralen Invasion hat eine große klinische Relevanz. Dieses Phänomen erschwert zum einen die kurative Resektion des Tumors, zum anderen ist sie für die z.T. sehr starken und quälenden Schmerzen der meisten Patienten mitverantwortlich (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die neurale Invasion basiert auf der Wechselwirkung zwischen PCC und dem Nervengewebe und es existieren bereits zahlreiche Erklärungsansätze für die Affinität der PCC zu den Nerven (Liu und Lu 2002).

Bisher durchgeführten Studien befassen sich jedoch ausschließlich mit der Affinität zwischen Karzinomzellen und den Nervenfasern. Alleine Swanson untersuchte erstmalig die Anziehung zwischen PCC und der glialen Komponente der peripheren Nerven (Swanson, McDermott et al. 2007). Swanson konnte beweisen, dass die spezifische Bindung des Muzins MUC1 an das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) die Adhäsion von PCC an die hSC vermittelt und damit zur neuralen Invasion beiträgt. Diese Erkenntnis lieferte einen völlig neuen Ansatz zur Erforschung der Pathogenese der neuronalen Karzinomzellinvasion im Pankreaskarzinom. Die Arbeit von Swanson rückte die Untersuchung der Affinität zwischen PCC und hSC mehr ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Bisher nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe Ceyhan deuten ebenfalls auf eine besondere Relevanz der Anziehung zwischen hSC und PCC im Rahmen der neuralen Invasion hin. Interessanterweise konnte *in vitro* eine zielgerichtete Migration der hSC zu den PCC aufgezeigt werden.

Beim aktuellen Stand der Forschung bleiben jedoch noch zahlreiche Fragen unbeantwortet. Trotz umfangreicher Studien zur neuralen Invasion im Pankreaskarzinom konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden, welche Struktur im Verlauf der Migration der PCC entlang der Nerven die Bahnfunktion übernimmt. Insbesondere die hSC stellen in diesem Zusammenhang eine bisher wenig erforschte Zelle dar. Diese die Axone umhüllenden Zellen könnten den PCC als primäre Zielstruktur dienen und damit

eine Adhäsion an die Nerven sowie die Karzinomzellmigration entlang der Nerven erst ermöglichen.

Es stellt sich nun insbesondere die Frage, durch welche Botenstoffe oder Signalwege die Affinität zwischen hSC und PCC zustande kommt bzw. verstärkt wird. Swanson konnte in diesem Zusammenhang bereits zwei relevante Moleküle aufzeigen (Swanson, McDermott et al. 2007).

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, weitere schwannzell-assoziierte Oberflächenmoleküle zu identifizieren, welche die Anziehung zwischen PCC und hSC vermitteln. Die Untersuchung erfolgte anhand der Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM. Beide Moleküle konnten bereits auf Schwannschen Zellen sowie im PDAC nachgewiesen werden (Fransen, Van Camp et al. 1997; Grumet 1997; Dhodapkar, Friedlander et al. 2001; Ben, Wang et al. 2010; Chen, Lee et al. 2011; Tsutsumi, Morohashi et al. 2011).

Basierend auf den Erkenntnissen von Ceyhan et al. 2010 wurde im Rahmen der Arbeit zunächst mit Hilfe von Migrationsassays die Spezifität der Affinität zwischen hSC und PCC überprüft. Anschließend wurde mittels Immunhistochemie, Western blot und qRT-PCR erstmals ein detailliertes Expressionsprofil von NrCAM und L1CAM auf den hSC und im Pankreaskarzinomgewebe erstellt. Im nächsten Schritt wurde die spezifische perineurale Expression von NrCAM und L1CAM quantitativ an immunhistochemischen Gewebeschnitten von 20 Pankreaskarzinompatienten mit der Hilfe von ImageJ bestimmt. Anschließend konnte die Stärke der neuralen Expression auf eine Korrelation mit dem Grad der Invasion der Nerven hin überprüft werden. Zuletzt wurde in eigens etablierten, heterotypen Adhäsions- und Migrationsassays der potentielle Einfluss von NrCAM und L1CAM auf die Zell-Zell-Adhäsion und auf die tumorgerichtete Migration der hSC im Pankreaskarzinom untersucht.

Längerfristig gesehen könnte ein fundiertes Wissen über die Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen der neuralen Invasion völlig neue Therapieansätze eröffnen, die sowohl zu einer verbesserten Schmerzbehandlung als auch zur Reduktion der Rezidivrate beim Pankreaskarzinom beitragen könnten.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines größeren Projektes angefertigt. Die hier behandelte Thematik ist sehr komplex und bisher wenig erforscht. Aus diesem Grund ist eine umfangreiche Untersuchung von potentiell relevanten

Faktoren im Rahmen mehrerer Arbeiten erforderlich. Es ist unvermeidlich, dass diese Arbeiten Ähnlichkeiten bei der Wahl der Analysemethoden und im Versuchsaufbau aufweisen. Aufgrund dessen wurden in den Arbeiten unterschiedliche Schwerpunkte gesetzt. Es besteht die Möglichkeit bei Interesse in anderen Arbeiten zusätzliche Beschreibungen, zum Beispiel zu speziellen Versuchsabläufen, nachzulesen (siehe zum Beispiel in der Dissertation von Frau Eva Brunner (Brunner 2013)).

Die zahlreichen in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden können nicht nur in der Humanmedizin sondern auch zur Klärung veterinärmedizinischer Fragestellungen genutzt werden. Insbesondere das neuartige 3D-Migrationsmodell (Ceyhan, Demir et al. 2008) ermöglicht auch der veterinärmedizinischen Wissenschaft die Wechselwirkungen verschiedener Zelllinien in einem künstlichen Umfeld nachzuahmen und zu erforschen. Ebenso die Weiterentwicklung der bereits veröffentlichten Version eines Adhäsionsassays (Issa, Nummer et al. 2009) im Rahmen dieser Arbeit kann der veterinärmedizinischen Forschung dienlich sein. Das modifizierte Adhäsionsassay ermöglicht eine Untersuchung von Faktoren, welche die heterotype Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen.

Eine klinisch-pathologische Studie an 9.342 Hunden und 6.504 Katzen zeigte, dass Erkrankungen des exokrinen Pankreas bei Hund und Katze häufig vorkommen (Hänichen und Minkus 1990). Dabei konnte in 0,43% der Fälle beim Hund und in 0,4% der Fälle bei der Katze ein Pankreaskarzinom nachgewiesen werden. Jedoch wird das Pankreaskarzinom beim Menschen weitaus häufiger diagnostiziert als beim Kleintier (Fossum 2007). Dies könnte vor allem mit der höheren durchschnittlichen Lebenserwartung des Menschen im Vergleich zu Hund und Katze im Zusammenhang stehen. Pankreaskarzinome scheinen zumindest bei der Katze zunehmend häufiger vorzukommen (Kraft, Dürr et al. 2003). Die Inzidenz liegt bei etwa 0,5% (Garvey und Zawie 1984). Beim Hund wird interessanterweise vergleichbar mit den neuroplastischen Veränderungen beim Menschen von einer Invasion des Karzinoms entlang der Nervenscheiden berichtet (Moulton 1978).

Folglich können Erkenntnisse im Bereich der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms und die damit verbundenen therapeutischen Ansätze zur Tumorthherapie oder zur Behandlung von tumorbedingten Schmerzen auch der Tiermedizin

zugutekommen.

IV MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien

1.1 Apparaturen

Cycler	Mastercycler, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Entwicklungsmaschine	PROTEC Optimax, Siemens, (München, GER)
Fluoreszenzlampe	Zeiss HBO 100, (Oberkochen, GER)
Geldokumentationssystem	GenoSmart, VWR, (Ismaning, GER)
Gelelektrophoresekammer	Compact M Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Biometra, (Göttingen, GER)
Gewebeaufschluss	TissueLyser LT, Quiagen, (Hilden, GER)
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP 200 S, (Nussloch, GER)
HOOD	Faster, (Ferrara, I)
Inkubator	Galaxy 170S, New Brunswick an eppendorf company (Enfield, USA)
Kryokontainer	Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
Kühlplatte	Medite, (Burgdorf, GER)
Laufkammer für SDS-Page	PerfectBlue Doppelgelsystem, PeqLab Biotechnologie GmbH, (Erlangen, GER)
Light Cycler	Light Cycler 480, Roche, (Basel, CH)
Magnetrührstab	MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
Mikrotom	Leica JUNG RM2055, (Nussloch, GER)
Mikroskop	Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, GER)
	Zeiss Observer Z1, (Oberkochen, GER)
	Zeiss Primo Vert, (Oberkochen, GER)

Module	Zeiss TempModule S, (Oberkochen, GER)
	Zeiss CO2 Module S, (Oberkochen, GER)
Nanodrop 2000	Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
Netzgerät	Power Pack 25, Biometra, (Göttingen, GER)
Paraffingießstation	Leica EG 1160, (Nussloch, GER)
Paraffin-Streckbad	GFL, (Burgwedel, GER)
Reinstwasser	Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
Photometer	Multiskan EX Microplate Photometer, Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
PipetBoy	Integra, (Fernwald, GER)
Roll-Mixer	Stuart Roller-SRT9, (Shaffordshire, UK)
Scanner	Nikon LS-5000 ED, (Zürich, CH)
Schüttler	neoLab, (Heidelberg, GER)
Semi-Dry-Blotter	PeqLab Biotechnologie GmbH, (Erlangen, GER)
Stereomikroskop	Olympus SZX7, (Hamburg, GER)
Thermoblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Thermomixer	Comfort 1,5ml, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Trockenschrank	UNB 400 Memmert GmbH + CoKG (Schwabach, GER)
Ultraschall-Homogenisator	Diagenode, (Lüttich, BE)
Vortexer	IKA Works, INC., MS 1 Minishaker, (Wilmington, USA)
Waage	Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
Wasserbad	Aqualine AL 18, Lauda, (Lauda-Königshofen, GER)

Wet-Blotter	PefectBlue Tank-Elektroblotter Web S, PeqLab Biotechnologie GmbH, (Erlangen, GER)
Zentrifuge	5415 R, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER) 5810 R, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, Marienfeld, (Lauda-Königshofen, GER)

1.2 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platte	96 well cell culture plate, Greiner Bio-One GmbH, (Frickenhausen, GER)
96-well-Platte	Light Cycler 480 Multiwell Plate 96, Roche, (Basel, CH)
Chromatographiepapier	Whatman International Ltd., (Maidstone, UK)
Dako Pen	DAKO, (Hamburg, GER)
FluoroDish	Tissue culture Dish with Cover Glass Bottom, WPI (Sarasota, USA)
Filter	sterile Filtereinheiten, Millipore GmbH, (Schwalbach, GER)
GATC Böxle	Biotech AG, (Konstanz, GER)
PCR-Folie	Adhäs. PCR Folie, Sarstedt, (Nürnberg, GER)
Pipetten	Eppendorf Pipetten Ratiolab, (Dreieich, GER)
Pipettenspitzen	Starlab, (Hamburg, GER)
Pipetten, steril	Greiner Bio-One, (Kremsmünster, A)

PVDF Transfer-Membran	Millipore GmbH, Billerica, (Massachusetts, USA)
Tube	safe lock tubes, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Reagenzröhrchen	Falcon-Röhrchen, Ratiolab, (Dreieich, GER)
Röntgenfilm	Fuji Medical X-Ray Film, (Düsseldorf, GER)
Zellkulturflaschen	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, (Frickenhausen, GER)
Zellschaber	Cell lifter, Costar, (Washington, US)

1.3 Chemikalien

- 6-Aminohexanoic acid, Sigma, (St. Louis, USA)
- Agarose, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Ammoniumpersulfate (10%), Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Amphotericin B (250 µg/ml), PAA, (Pasching, A)
- B-27 Supplement (50x), Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Boric acid, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Chloroform/Trichlormethan, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Cell Dissociation Solution non enzymatic 1x, Sigma, (St. Louis, USA)
- CFDA SE Cell Tracer Kit Vybrant®, Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Citronensäure-Monohydrat, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, (Basel, CH)
- DAKO Envision system, DAKO für Kaninchen und Maus, (Hamburg, GER)
- DAB, DAKO, (Hamburg, GER)
- Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)

- DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)
- dNTP's, Promega, (Fitchburg, USA)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, (Buckinghamshire, UK)
- ECM gel, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Eosin, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Ethanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Ethylendiamin-tetraessigsäure/EDTA, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Ethidium bromide, Q-Biogene, (Irvine, USA)
- FBS, Scien Cell, (Carlsbad, USA)
- Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Formaldehydlösung 3,5-3,7%, Fischar, (Saarbrücken, GER)
- Go Taq Flexi Buffer, Promega, (Fitchburg, USA)
- Go Taq DNA Polymerase, Promega, (Fitchburg, USA)
- Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
- Glycin, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), PAA, (Pasching, A)
- HCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Hematoxylin, Merck (Darmstadt, GER)
- HEPES buffer solution, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit, Applied Biosystems, (Kalifornien, USA)
- Isopropanol, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Kollagenase II, PAA, (Pasching, A)
- LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix, Roche, (Basel, CH)
- Magnesiumchlorid (10mM), PeqLab Biotechnologie GmbH, (Erlangen, GER)
- MEM, Biochrom, (Berlin, GER)
- Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Methanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)

- Neurobasal TM Medium (-) L-Glutamine, Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Normal goat serum, KPL, (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Nuclease-Free water, Ambion, (Austin, US)
- Nupage transfer buffer (20x), Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- PBS, Biochrom AG, (Berlin, GER)
- Penicillin 10,00 U/ml / Streptomycin 10,00 µg/ml Solution, ScienCell, (Carlsbad, USA)
- Penicillin-Streptomycin, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
- Poly-D-Lysine Hydrobromid, Sigma, (St. Louis, USA)
- Primer (forward and reverse) 10µM, Promega, (Fitchburg, USA)
- RNeasy away, Molecular BioProducts, (San Diego, US)
- RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, (Hilden, GER)
- Roticlear, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Rotiphorese (AA/Bis), Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- RQ1 RNase-Free DNase, Promega, (Fitchburg, USA)
- SCGS, ScienCell, (Carlsbad, USA)
- Schwann Cell Medium, ScienCell, (Carlsbad, USA)
- SDS ultra pure >99%, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Spectra multicolor high range protein ladder, Thermo Scientific, (Massachusetts, USA)
- TEMED, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Titrisplex 3 R, Merck, (Darmstadt, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Triton X 100, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Trizma base, Sigma, (St. Louis, USA)
- Trizol, Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Trypan Blue Stain 0,4%, Invitrogen, (Kalifornien, USA)
- Trypsin-EDTA Solution (1x), Sigma, (St. Louis, USA)
- Tween 20, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- VectaMount, Vector, (Kalifornien, USA)
- Wasserstoffperoxid 30%, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)

1.4 Puffer und Lösungen

Zusammensetzung:

Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd 8% 50ml PBS 50ml
Ammoniumpersulfate 10%	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g fc: 0,3 M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer II	Tris 3,03g fc: 0,025M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O
Citratpuffer	Citronensäure-Monohydrat 21g ad 500ml H ₂ O
Kathodenpuffer	Tris 3,03g fc: 0,025 M ε-Amino-capronsäure 5,24g fc: 0,04M Methanol 200 ml fc: 20%
Lower Tris 4x	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4% (= 4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 8,8
LSB 6x (Laemmli-Puffer) für 200 ml	35 ml Tris HCl (1M9 pH6,8 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto
Milch 5% (in PBS)	Milchpulver 5% Tween 20 0,1%
Milch 7,5% (in TBS)	Milchpulver 7,5% Tween 20 0,1%
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Natriumchlorid 137mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
PBS/Tween (in PBS)	Tween 20 0,1%
Puffer-Lösung zum Blotten (wet blot System)	Nupage transfer buffer (1x) SDS 0,037%

TBE (x25)	Trizma 302,75g Boric acid 137,57g EDTA 0,3g ad 1 l H ₂ O
TBS (10x)	Trizma 24,22g NaCl 87,66g ad 1 l H ₂ O
TBS/Tween (in TBS)	Tween 20 0,1%
Triton X (in PBS)	Triton X 0,5%
RIPA für 200 ml	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl, 1mM Na ₂ EDTA 1% NP-40 1% sodium deoxycholate
Sammelgel 4% (10ml)	Bidest 6,2 ml 4 x UT 2,5 ml AA/BIS 1,35 ml TEMED 20 µl 10% APS 30 µl
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g fc: 250 mM Glycin 144g fc: 1,99M SDS 10g fc: 1% ad 1 l H ₂ O
SDS Polyacrylamidgel 7,5% (40 ml)	Bidest 19,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 10 ml TEMED 40 µl 10% APS 450 µl
Trenngel 7,5% (10ml)	Bidest 4,9 ml 4 x UT 2,5 ml AA/BIS 2,5 ml TEMED 10 µl 10% APS 112,5 µl

1.5 Zellkulturmedien

Für SU86.86 und T3M4:

RPMI 1640 with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)

ZUSÄTZE:

- 10% Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- 1% Penicillin-Streptomycin, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)

Für humane Schwannsche Zellen:

Schwann Cell Medium, ScienCell, (Carlsbad, USA)

ZUSÄTZE:

- 5% FBS, ScienCell, (Carlsbad, USA)
- 1% Penicillin 10,00 U/ml / Streptomycin 10,00 µg/ml Solution, ScienCell, (Carlsbad, USA)
- 1% SCGS, ScienCell, (Carlsbad, USA)

Für Ln-229 (LN), MiaPaCa-2, BJ, DLD-1:

DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)

ZUSÄTZE:

- 10% Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- 1% Penicillin-Streptomycin, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)

Für PaSC (von der Ratte):

DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)

ZUSÄTZE:

- 20% Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- 1% Penicillin-Streptomycin, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- 1% Amphotericin B (250 µg/ml), PAA, (Pasching, A)

1.6 Zellen

Human Schwann Cells:

- ScienCell, (Carlsbad, USA)
- primäre Zellen
- aus einem humanen Nervus ischiadicus isoliert

BJ:

- LCG Standards, (Wesel, GER)
- ATCC CRL-2522
- aus der Vorhaut eines Neugeborenen isoliert

MiaPaCa-2:

- ATCC, (Manassas, USA)
- ATCC CRL-1420
- undifferenzierte Tumorzellen
- aus dem Pankreas eines 65 Jahre alten Mannes kaukasischer Abstammung mit PDAC isoliert

SU86.86:

- ATCC, (Manassas, USA)
- ATCC CRL-1837
- aus einer Lebermetastase eines PDAC einer 57 Jahre alten Frau kaukasischer Abstammung isoliert

T3M4:

- freundlicherweise von Prof. R.S. Metzgar (Duke University) zur Verfügung gestellt
- ATCC HTB-134
- aus einer Lymphknotenmetastase eines PDAC eines 64 Jahre alten Mannes isoliert

Ln-229:

- freundlicherweise von Prof. J. Schlegel (Neuropathologie, TU München) zur Verfügung gestellt
- ATCC CRL-2610
- isoliert aus dem Glioblastom im rechten Temporallappen des Großhirns eines 65 Jahre alten Mannes

1.7 Antikörper

1.7.1 Primärantikörper

Antikörper (Spezies)	Bezugsquelle
anti-L1CAM (Kaninchen, polyklonal)	Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
anti-L1CAM (Nr. 1): L1-35.9	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, DKFZ Heidelberg (D-69120)
anti-L1CAM (Nr. 2): L1-1-38.12	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, DKFZ Heidelberg (D-69120)
anti-L1CAM (Nr. 3): L1-OV549.20	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, DKFZ Heidelberg (D-69120)
anti-L1CAM (Nr. 4): L1-OV543.18	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, DKFZ Heidelberg (D-69120)

anti-L1CAM (Nr. 7): L1-11A	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Altevogt, DKFZ Heidelberg (D-69120)
anti-NrCAM (Kaninchen, polyklonal)	Abcam, (Cambridge, GB)
anti-GAPDH (Maus, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology, (Kalifornien, USA)
Mouse IgG1 Isotype Control	Invitrogen, (Kalifornien, USA)
Rabbit Isotype Control	Invitrogen, (Kalifornien, USA)

1.7.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
HRP anti-Maus	DAKO, (Hamburg, GER)
HRP anti-Kaninchen	DAKO, (Hamburg, GER)
anti-Kaninchen IgG	GE Healthcare, (Buckinghamshire, UK)
anti-Maus IgG/HRP	Santa Cruz Biotechnology, (Kalifornien, USA)

1.8 Primer

Name	Oligo Name	Sequenz	Richtung	Bezugsquelle
Cyclophilin B	RT 69	TGTGGTGTGTTGGCAAAGTTC	vorwärts	Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
	RT 70	GTTTATCCCGGCTGTCTGTC	rückwärts	
NrCAM	RT 267	TGCCGGGGCTAGAGCCCTTT	vorwärts	Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
	RT 268	ATGCCATTGCGGTGGCTCGG	rückwärts	
L1CAM	RT 243	CTGCCACGCCCACTTCCCAG	vorwärts	Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
	RT 244	CAGGCGCGGCTTCCTGTCAA	rückwärts	

1.9 Patientenkollektiv und Gewebe

Es wurden zum einen Gewebeproben von normalem humanem Pankreas untersucht. Diese stammten von insgesamt 42 gesunden, verstorbenen Organspendern, für die kein passender Empfänger gefunden wurde.

Zum anderen wurden mit vorangegangener Einwilligung Gewebeproben von 49 Patienten mit PDAC untersucht, bei denen eine Pankreaskopfresektion vorgenommen worden war. Dieses Patientenkollektiv (n=49) setzte sich aus 17 Frauen und 32 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von 59.7 Jahren zusammen. Die Bestimmung des Tumorstadiums erfolgte nach den Richtlinien der internationalen Union gegen Krebskrankheiten (UICC 2010). Von den Tumoren der insgesamt 49 Patienten mit PDAC zeigten 4 ein T1-Stadium, 8 ein T2-Stadium, 33 ein T3-Stadium und 4 ein T4-Stadium.

1.10 Software

Ascent Software	Termo Scientific, (Massachusetts, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, (La Jolla, CA, USA)
ImageJ	National Institutes of Health, (Bethesda, USA)
Imaging software	Olympus analySIS software und Zeiss KS300 Program
Light Cycler 480-Software	Roche, (Basel, CH)
Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft

2 Methoden

Aufgrund der Komplexität der hier behandelten Thematik wurde diese Arbeit und andere Teilarbeiten im Rahmen eines größeren Projektes angefertigt. Daher war es unvermeidlich, dass sich bei den Teilprojekten Ähnlichkeiten im Versuchsaufbau ergaben. Aufgrund dessen wurden in den diversen Teilarbeiten unterschiedliche Schwerpunkte hinsichtlich der Ausführlichkeit der Beschreibung gelegt. Es besteht die Möglichkeit bei Interesse in anderen Arbeiten detailliertere Ausführungen zu gewissen Versuchsabläufen nachzulesen (siehe zum Beispiel in der Dissertation von Frau Eva Brunner (Brunner 2013)).

2.1 *Histologische Untersuchungen*

Der immunhistochemische Nachweis von NrCAM und L1CAM wurde durchgeführt, um die spezifische perineurale Präsenz dieser Oberflächenmoleküle quantitativ bestimmen zu können. Die pathohistologische Untersuchung wurde an Geweben von 10 gesunden Spendern und von 20 Patienten mit PDAC durchgeführt. Danach wurde, unter Berücksichtigung des Grades der neuralen Invasion (keine, perineurale oder endoneurale Invasion), die Immunoreaktivität in den einzelnen Nerven der verschiedenen Gewebe miteinander verglichen.

2.1.1 Histologische Aufbereitung der Gewebeproben

Unmittelbar nach der Entnahme des Gewebes wurde es 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd in PBS bei 4°C fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe über 24 Stunden in 70%igem Ethanol bei 4°C ausgewaschen und im Gewebeinfiltrationsautomat durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Danach wurden die Proben in Paraffin eingebettet und mit einem Rotationsmikrotom etwa 3µm dick

geschnitten. Anschließend wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 24 Stunden im Wärmeschrank getrocknet. Die fertigen Schnitte wurden mittels 3-mal 10-minütiger Behandlung mit Roticlear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die auf diese Weise vorbehandelten Gewebeschnitte wurden dann mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt oder für immunhistochemische Färbung weiterverarbeitet.

2.1.2 Immunhistochemie NrCAM

Die deparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach zwei Waschgängen mit aq. dest. und TBST fünf Minuten lang mit 0,5%igem Triton X100 permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschgang mit TBST folgte die Sättigung der endogenen Peroxidasen im Gewebe mittels 3%igem Hydrogenperoxid. Danach folgte ein weiterer Waschschriff mit aq. dest. und die Objektträger wurden mit 10%igem Normal-goat-serum für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper anti-NrCAM (1:50000 verdünnt in TBST) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach 3-maligem Waschen mit TBST die Behandlung mit dem Sekundärantikörper Meerretichperoxidase (HRP-anti-rabbit) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nochmals 2-mal 5 Minuten mit TBST gewaschen und mit Diaminobenzidin (DAB) die immunchemische Reaktion visualisiert. Die Reaktion wurde nach 30 Sekunden in aq. dest. gestoppt. Zuletzt wurde das Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach 3-mal 5-minütiger Behandlung mit Roticlear eingedeckelt.

In den fertigen Präparaten wurden alle Nerven einzeln mit dem Mikroskop abfotografiert und durchnummeriert. Anschließend wurde die Intensität der Färbung jedes einzelnen Nervens mittels der Computersoftware ImageJ ausgewertet.

2.1.3 Immunhistochemie L1CAM

Hier wurden die deparaffinierten und rehydrierten Schnitte nach zwei Waschgängen mit aq. dest. und TBST zunächst noch 2-mal 5 Minuten in Citratpuffer in der Mikrowelle (bei 600W) erhitzt. Nach 20-minütigem Auskühlen folgte ein weiterer Waschschrift mit TBST. Der restliche Versuchsablauf gleicht dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen. Der Primärantikörper anti-L1CAM (1:700 in TBST) wurde ebenfalls über Nacht bei 4°C inkubiert. Die immunchemische Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) wurde nach 15 Minuten in aq. dest. gestoppt.

2.1.4 Quantitative Auswertung der Immunoreaktivität

Die quantitative Auswertung der Immunoreaktivität wurde an allen immunhistochemisch behandelten (sowohl mit NrCAM als auch mit L1CAM) Gewebeschnitten durchgeführt. Jeder einzelne Nerv wurde mit Hilfe des Mikroskops abfotografiert, nummeriert und die Bilder dann mittels der Computersoftware ImageJ ausgewertet (Abb. 2).

Zunächst wurde das Originalbild (Abb. 2, A) mit ImageJ geöffnet und in ein 8-Bit Dateiformat (Abb. 2, B) konvertiert. Als nächstes wurde das Bild neu kalibriert (Abb. 2, C) und der Maßstab von inches in μm geändert. Hierfür wurde die Maßstabskala auf dem Originalbild mit dem Werkzeug „straight“ nachgefahren und mit Hilfe der Funktion „set scale“ die bekannte Distanz eingegeben. Darauf folgte die Einstellung der erwünschten Messparameter (Abb. 2, D). Anschließend wurde der Schwellwert zur Sichtbarmachung des immunoreaktiven Bereiches mittels der Funktion „threshold“ festgelegt (Abb. 2, E). Dabei wurde darauf geachtet, dass nur die deutlich braun gefärbten Bereiche in die Messung mit einbezogen wurden. Im nächsten Schritt wurde der repräsentative Bereich im Bild mit dem Werkzeug „freehand selections“ von Hand umfahren. Bei dieser Untersuchung wurde der Nerv inklusive Perineurium in die Berechnung einbezogen.

Als Messparameter wurde zum einen die Gesamtfläche des von Hand markierten repräsentativen Bereiches in μm^2 bestimmt. Zum anderen wurde der immunoreak-

tive Bereich in μm^2 bestimmt. Aus diesen beiden Messwerten wurde der prozentuale Anteil des immunoreaktiven Bereichs am gesamten repräsentativen Bereich errechnet (Abb. 2, F).

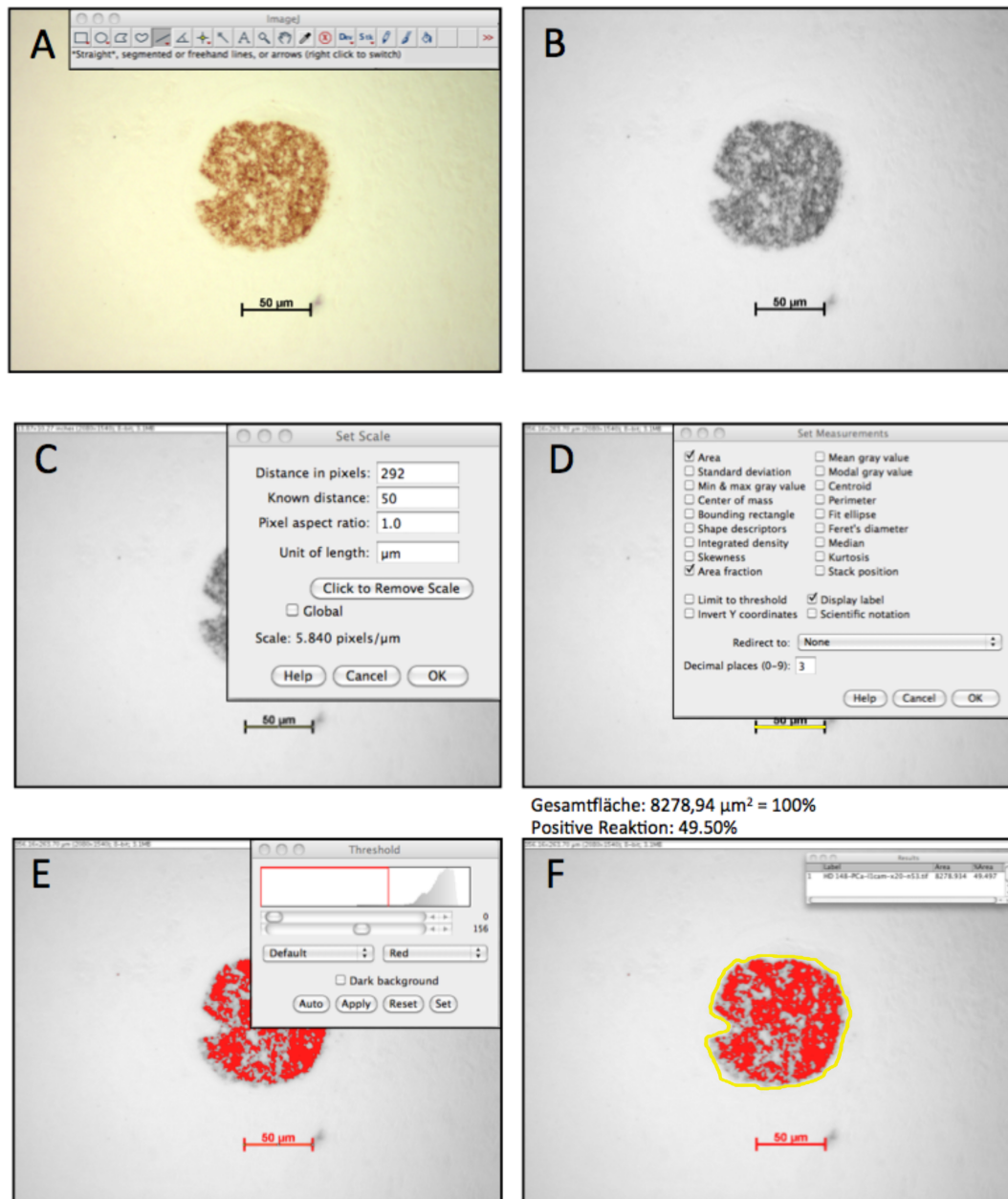


Abbildung 2: Computerunterstützte Auswertung mittels ImageJ am Beispiel eines mit anti-L1CAM behandelten PCa-Gewebeschnittes: A=Originalbild mit ImageJ geöffnet; B=Das gleiche Bild A im 8-Bit Format; C=Skalierung der Bildes; D=Festlegung der Messparameter; E=Festlegung des Schwellwertes zur Sichtbarmachung des immunoreaktiven Bereiches; F=Markierung des repräsentativen Gewebebereichs von Hand und Messung der Gesamtfläche dessen sowie des prozentualen Anteils des immunoreaktiven Bereichs am vom Hand markierten (Gesamtfläche: $8278,94 \mu\text{m}^2$, prozentualer Anteil des immunoreaktiven Bereichs: 49,50%)

2.1.5 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Alle Gewebeschnitte der immunhistochemischen Färbung mit anti-NrCAM und anti-L1CAM wurden zusätzlich mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die HE-Färbung ist eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie und dient der Darstellung von Gewebestrukturen mittels des Kernfarbstoffs Hämatoxylin und des Plasmafarbstoffs Eosin. Mit Hilfe dieser Färbung erfolgte die Klassifizierung der neuralen Invasion der Nerven in den verschiedenen Gewebeschnitten. Die depa- raffinierten und rehydrierten Schnitte wurden 15 Sekunden lang mit Hämatoxylin benetzen und im Anschluss 15 Minuten lang unter fließendem Wasser vorsichtig gespült. Danach wurden die Schnitte 6 Minuten lang in Eosin eingelegt und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach 3-mal 5-minütiger Behandlung mit Roticlear wurden die Präparate eingedeckelt.

2.1.6 Klassifizierung der neuralen Invasion

Die Klassifizierung wurde anhand der HE-gefärbten PDAC-Gewebeschnitte von zwei fachkundigen Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Es wurden drei Schweregrade der neuralen Invasion unterschieden. Bei Grad 0 war nur das umliegende Gewebe und nicht der Nerv selbst von den Karzinomzellen befallen (Abb. 3, A). Beschränkte sich der Karzinomzellenbefall auf das Perineurium der Nerven wurde die Invasion in Grad 1 eingestuft (Abb. 3, B). Grad 2 wurde vergeben, wenn die Karzinomzellen das Perineurium durchdrungen hatten (Abb. 3, C) oder das Endoneurium bereits durch den Befall angegriffen war (Abb. 3, D).

Pankreaskarzinom

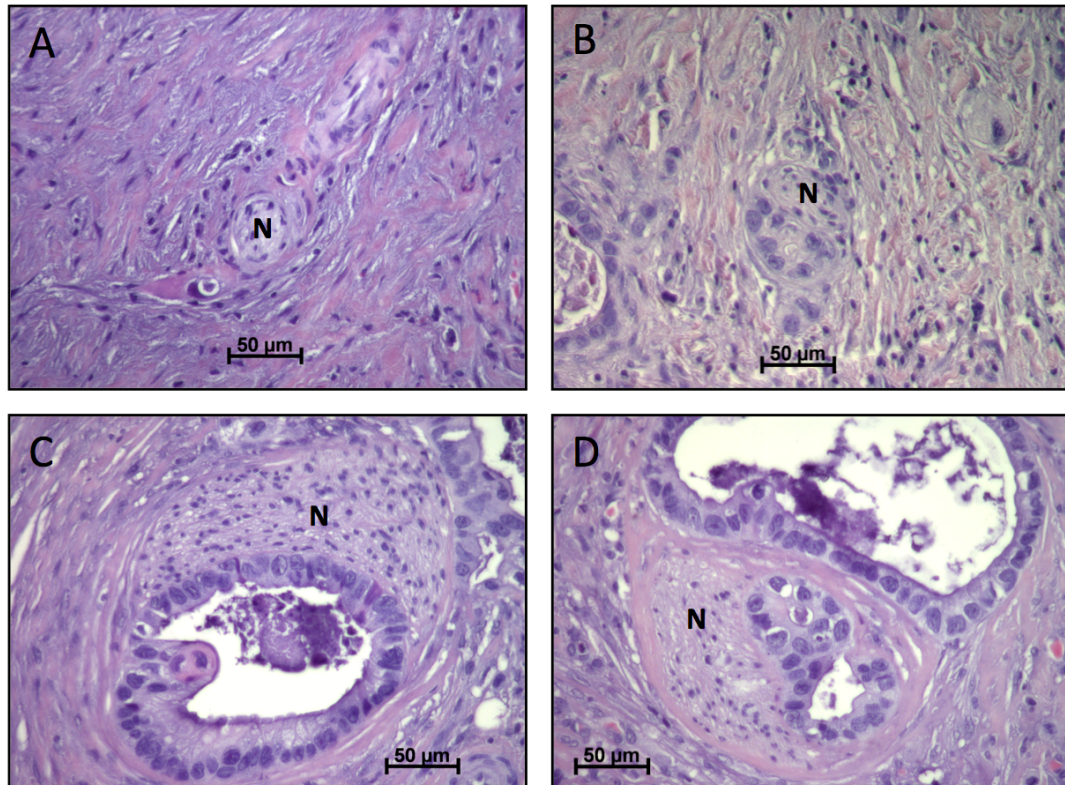


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Beispielbilder HE-gefärbter PDAC-Gewebeschnitte:
 A=Nerv ohne neurale Invasion (=Grad 0); B+C=Nerv mit perineuraler Invasion (= Grad 1); D=Nerv mit endoneuraler Invasion (=Grad 2); der Nerv ist jeweils mit einem N gekennzeichnet

2.1.7 Immunhistochemie

Um neben den Nerven noch weitere Lokalisationen der Oberflächenmoleküle identifizieren und genauer definieren zu können, wurden zusätzlich immunhistochemische Schnitte mit L1CAM und NrCAM angefertigt, die nach der immunchemischen Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) für 15 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden. Nach einem 15-minütigen Waschgang unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und danach eingedeckelt.

2.2 *Molekularbiologische Untersuchungen*

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden zum einen durchgeführt, um das Basisexpressionsprofil von NrCAM und L1CAM auf hSC zu untersuchen. Des Weiteren wurden Gewebe von normalem Pankreas und PDAC-Gewebe auf die beiden Oberflächenmoleküle hin untersucht. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Western blot eine Probe mit Hirngewebe einer Ratte mitgeführt, da die Existenz der beiden untersuchten Adhäsionsmoleküle in diesem Gewebe als erwiesen gilt.

2.2.1 *Aufbereitung der Lysate zur Untersuchung mittels Western blot*

Die verwendeten Gewebeproben wurden direkt nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit dem Qiagen TissueLyser LT homogenisiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei minus 80°C eingefroren.

Die zu analysierenden Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen kultiviert bis sie zu ca. 90% konfluent waren. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde die Zellen mit 100µl RIPA-Puffer lysiert, dem zuvor ein Proteinase-Inhibitor zugegeben wurde. Danach konnten die Zellen mit einem Plastikscherer vollständig vom Flaschenboden gelöst werden. Im Anschluss wurden die suspendierten Zellen in Tubes überführt und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators aufgeschlossen.

Um für die Analyse mittels Western blot Lysate mit den gleichen Konzentrationen herstellen zu können, wurde deren Konzentration photometrisch bestimmt. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit verwendet. Dessen Farbreaktion wird zum einen auf Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu zurückgeführt. Zum anderen beruht der hochempfindliche kolorimetrische Nachweis auf der Detektion von Cu^{1+} durch Bicinchoninsäure. Durch die Chelatbildung von zwei Molekülen BCA mit einem Kupfer-Kation entsteht ein intensiv violette Reaktionsprodukt. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional zur Proteingesamtkonzentration. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurden Proteinstandardkonzentrationen

(bovines Serumalbumin; 0-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8 µg/µl) hergestellt. Die Proteinbestimmung aller Proben inklusive der Standards wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet, um Messfehler durch Ungenauigkeiten beim Pipetieren zu vermeiden. Im Anschluss wurden aus den Lysaten Proben mit gleichen Konzentrationen (30 µg) hergestellt.

Danach wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt, kurz anzentrifugiert und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um eine ausreichende Denaturierung der Proteine zu erreichen. Daraufhin wurden die Proben 3 Minuten auf Eis abgekühlt und erneut kurz zentrifugiert. Im Anschluss konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

2.2.2 SDS-Page

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mittels SDS-Page mit einem vertikalen Doppelsystem von PeqLab. Um eine Verunreinigung mit Fremdprotein zu vermeiden, wurden die Apparaturen zunächst sorgfältig gereinigt. Nach dem Zusammenbau des Systems wurden die Reagenzien für das 7,5%ige Trenngel in einem Falcon zusammengemischt. Dabei wurde TEMED zuletzt hinzugefügt, da diese Substanz zu einer raschen Polymerisation des Gels führt. Unmittelbar danach wurde das Gel zwischen die beiden Glasplatten des zusammengebauten Systems gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Dadurch wurde die Entstehung von Blasen verhindert und es bildete sich eine glatte Geloberfläche. Nach 20 Minuten war das Gel ausgehärtet und das überständige Isopropanol wurde abgegossen. Im Anschluss wurde der Plattenzwischenraum mit Chromatographiepapier getrocknet, das 4%ige Sammelgel über das Trenngel aufgebracht und der Kamm zwischen die beiden Glasplatten geschoben. Das Gel war nach weiteren 20 Minuten ausgehärtet, wurde von den Silikonmatten der Gießbasis vorsichtig entfernt und in die Elektrophoresekammer des Systems eingehängt. Danach wurde die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt und nach Entfernung des Kamms die Proben auf das Gel aufgetragen. Dabei wurde in die erste und letzte Tasche des Gels zur Bestimmung der Proteingröße 10 bis 15 µl Marker eingefüllt. Zuletzt wurde der Kammerdeckel mit

den beiden Elektroden auf das Becken gesetzt, um den Stromkreis zu schließen. Das Netzgerät wurde angeschlossen und auf 300 Volt und 15 mA eingestellt. Nach 15 Stunden hatte die Laufront den unteren Rand des Gels erreicht und die Elektrophorese konnte beendet werden.

2.2.3 Western blot NrCAM

Zum Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde mit einem Semi-Dry-Blotter von PeqLab gearbeitet. Zunächst wurden die PVDF-Membran und 15 Whatman-Paper auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und 4 Plastischalen mit Ethanol und den drei Blotting-Puffern aufgefüllt. Danach wurde die Membran 3 Sekunden in Ethanol äquilibriert und anschließend im Anodenpuffer 2 geschwenkt bis alle Schlieren verschwunden waren. Nachdem die Whatman-Paper mit den jeweiligen Puffern getränkt worden waren, wurde die Blottingkammer in folgender Reihenfolge bestückt:

6 Whatman-Paper (in Anodenpuffer 1 getränkt),

3 Whatman-Paper (in Anodenpuffer 2 getränkt),

PVDF-Membran,

Trenngel,

6 Whatman-Paper (im Kathodenpuffer getränkt).

Luftblasen wurden durch Rollen mit einer Pipette entfernt. Danach wurde die Kammer mit Schraubknöpfen unter leichtem Druck verschlossen und das Netzgerät angeschlossen. Es wurde für 2 Stunden bei 300 Volt geblottet. Die mA-Einstellung ergab sich aus der Größe der PVDF-Membran (Länge x Breite x 0,8). Nach den zwei Stunden wurde die Membran vorsichtig aus der Elektroblotting-Apparatur genommen und auf der Höhe von 55 kDa mit einem Skalpell längs geteilt. Die untere Hälfte der Membran wurde für die Behandlung mit anti-GAPDH verwendet.

Die obere Hälfte der Membran wurde zunächst bei Raumtemperatur 1 Stunde mit

7,5%iger Milch behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-NrCAM (1:5000 in 7,5%iger Milch) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran nach drei Waschschritten mit 7,5%iger Milch mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG/HRP (1:6000 in 7,5%iger Milch) bei Raumtemperatur eine Stunde lang behandelt. Nach weiteren Waschschritten mit 7,5%iger Milch und PBST wurde die Membran kurz in aq. dest. geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran mit einer ECL-Lösung nach den Angaben des Herstellers behandelt. Das Nachweisreagenz enthält eine Peroxidase (HRP), die die Oxidation von Luminol katalysiert. Dies verursacht eine Chemilumineszenz, die zur Schwärzung des Röntgenfilms führt. Die Banden waren nach einer Detektionszeit von 30 Sekunden deutlich zu sehen.

Die Intensität der Banden auf dem Röntgenfilm wurde densitometrisch mittels der ImageJ Software analysiert. Anhand der Banden auf der mit anti-GAPDH behandelten Membran konnte beurteilt werden, ob jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren.

2.2.4 Western blot L1CAM

Aufgrund der Größe des Adhäsionsmoleküls L1CAM von 220 kDa wurde zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran mit einem Wet-Blotter von PeqLab gearbeitet. Vor dem Blot wurde das Gel auf der Höhe von 55 kDa mit einem Skalpell längs geteilt. Die untere Hälfte der Gels wurde mit dem Semi-Dry-System geblottet und die Membran zur Behandlung mit anti-GAPDH verwendet. Der obere Teil des Gels wurde wie bereits erwähnt mit einem Wet-Blot-System geblottet. Hierfür wurden 4 Whatman-Paper und die PVDF-Membran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Blotting-Kassetten wurden in einer mit Transferpuffer gefüllten Plastikwanne bestückt. Die PVDF-Membran wurde zunächst 3 Sekunden in Ethanol äquilibriert und anschließend im Puffer geschwenkt, bis alle Schlieren verschwunden waren. Das Gel und die PVDF-Membran wurden zwischen die zwei Fasermatten der Kassette gelegt. Dabei wurden zwischen Gel bzw. Membran und der Fasermatte zusätzlich jeweils

zwei mit Puffer getränkte Whatman-Paper platziert (Abb. 4). Es wurde darauf geachtet, dass sich das Gel auf der Seite der Kathode befand und die Membran auf der Seite der Anode. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe einer 10 ml Pipette von Luftblasen befreit und die fest verschlossene Kassette in den mit Puffer gefüllten Tank eingehängt. Danach wurde der Puffertank verschlossen und das Netzgerät angeschlossen. Bei einer Spannung von 30 Volt und maximaler Stromstärke wurde 4 Stunden lang geblottet. Währenddessen war zur Wärmeableitung ein Wasserzirkulationssystem mit kaltem Wasser angeschlossen.

Nach dem Blot wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 5%iger Milch behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für die Reaktion mit dem Primärantikörper zu blockieren. Der Primärantikörper anti-L1CAM (1:500 in PBST) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte mit PBST. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG/HRP (1:2000 in PBST) inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte mit PBST, bevor die Membran mit der ECL-Lösung wie in Kapitel 2.2.3 behandelt und entwickelt wurde. Die Banden waren nach einer Detektionszeit von 10 Minuten deutlich zu sehen.

Die Intensität der Banden auf dem Röntgenfilm wurde ebenfalls densitometrisch mit Hilfe der ImageJ Software analysiert. Anhand der Banden auf der mit anti-GAPDH behandelten Membran konnte wiederum beurteilt werden, ob jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren.

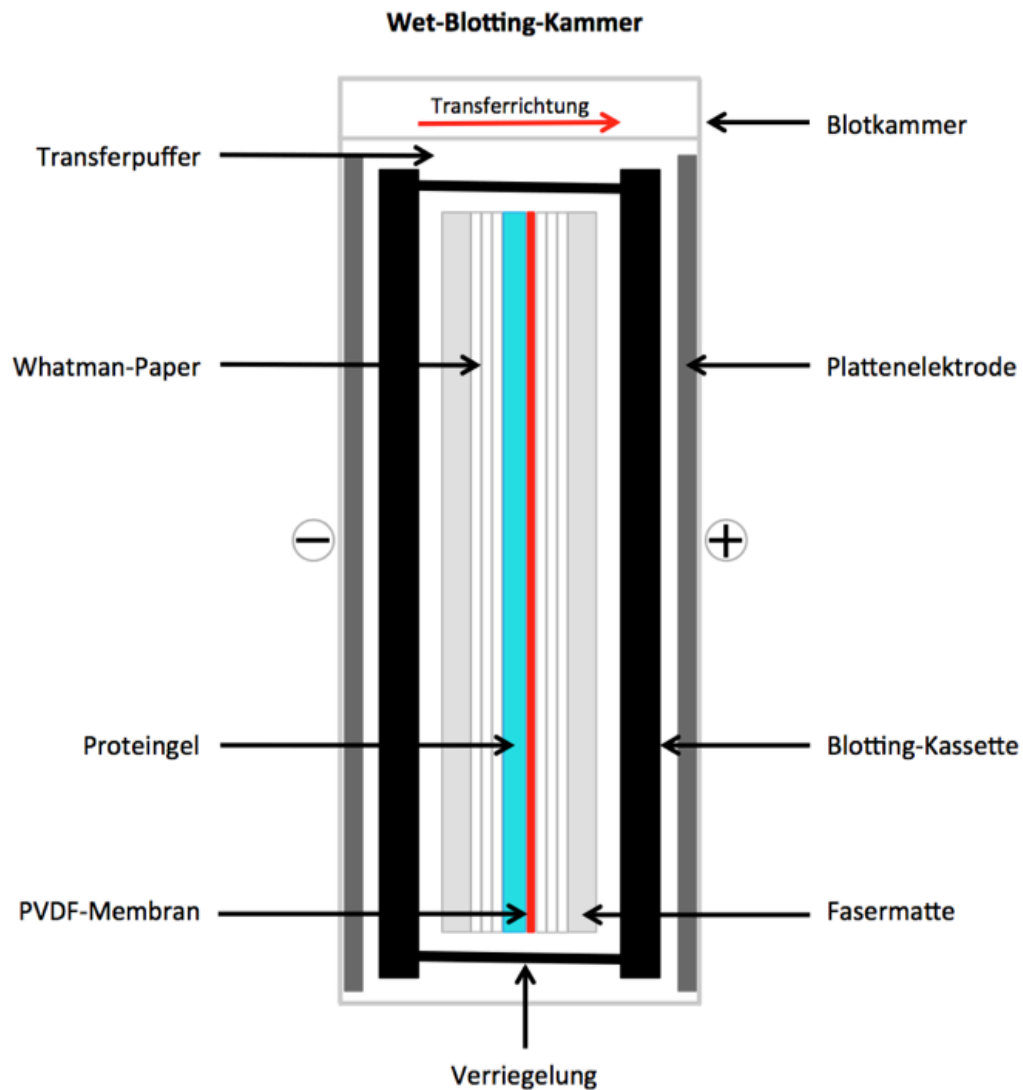


Abbildung 4: schematische Darstellung einer Wet-Blotting-Kammer

2.2.5 Western blot GAPDH

Um die relative Menge von NrCAM und L1CAM in den Proben objektiv vergleichen zu können, wurde bei jedem Versuch auf der jeweiligen Membran GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als Ladungskontrolle nachgewiesen. GAPDH ist ein Enzym, das nicht nur bei der Energiegewinnung durch Glykolyse eine wichtige Rolle spielt sondern auch an einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse beteiligt ist. Deshalb ist die Expression von GAPDH vor allem in Zellen auch unter sehr unterschiedlichen Bedingungen sehr stabil. GAPDH hat

ein Gewicht von ungefähr 37 kDa.

Die Membran zur Behandlung mit GAPDH wurde mit einem Semi-Dry-System wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben geblottet. Geblockt wurde die Membran mit 5%iger Milch. Die Waschschrirte wurden dagegen mit PBST durchgeföhrt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-GAPDH (1:5000 in PBST) erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Sekundärantikörper anti-Maus IgG/HRP (1:2000 in PBST) verblieb 1 h bei Raumtemperatur auf der Membran.

2.2.6 Aufbereitung von Gewebelysaten zur Untersuchung mittels PCR

Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Aufbereitung wurden jeweils 25 mg des Gewebes in ein 2 ml Tube gegeben. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit je 1 ml Trizol bedeckt und einem TissueLyser LT von Qiagen homogenisiert (30 bis 50 Hz für 3 Minuten). Danach wurde das homogenisierte Gewebe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Nukleoprotein-komplexe zu erreichen. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Tubes gut verschlossen und 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben zur Phasenseparation bei 12.000 x g (mittlere Erdschwerebeschleunigung) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dabei entstand eine untere, rote Phenol/Chloroform-Phase und eine obere, farblose wässrige Phase. Dazwischen bildete sich eine weiße Interphase von fester Konsistenz. Daraufhin wurde die obere, RNA-haltige Phase vorsichtig in ein frisches Tube abgefüllt. Die organische Phase, in der DNA und Proteine enthalten waren wurde verworfen. Danach wurde die wässrige Phase zur Präzipitation der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 12.000 x g für ebenfalls 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde am Boden des Tubes als weißes Pellet sichtbar und der wässrige Überstand wurde verworfen. Abschließend erfolgte ein Waschgang mit 1 ml 75%igem Ethanol. Nach dem Zentrifugieren (7.500 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der Überstand wieder verworfen und das gewaschene RNA-Pellet luftgetrocknet.

Zuletzt wurde das Pellet in 30 µl RNase freiem Wasser für 10 Minuten bei 60°C im Thermoblock gelöst.

Gleich im Anschluss wurde die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde die Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Anhand des 260/280-Quotienten konnte die Reinheit der RNA beurteilt werden.

Bei geeigneter Qualität der RNA wurde diese mittels DNase-Verdau von genomischer DNA befreit. Es wurde mit der QR1 DNase von Promega gearbeitet, um einzel- und doppelsträngige DNA in den Probelösungen abzubauen. Für diesen Verdau wurden 2 µg der isolierten RNA, 2 µl RQ1 RNase freien DNase, 1 µl RQ1 RNase freier DNase Reaktionspuffer und RNase freies Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde 1 µl der QR1 RNase freien Stop-Lösung hinzugegeben und durch eine erneute Inkubation für 10 Minuten bei 65°C die DNase wieder inaktiviert.

Unmittelbar danach erfolgte die cDNA-Synthese. Die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Das Kit enthält mehrere Reagenzien, die in der unten aufgeführten Zusammensetzung zum Mastermix zusammengefügt wurden.

Mastermix:

10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
Nuclease freies Wasser	4,2 µl
Gesamtvolumen/Reaktion	10 µl

Zu jedem der 2 µg der RNA enthaltenden Ansätze wurde 10 µl Mastermix gegeben. Zur Kontrolle des DNase-Verdaus wurde zusätzlich bei jedem Versuchsdurchlauf ein Mastermix ohne reverse Transkriptase angesetzt und zu einer der Proben gegeben. Zunächst wurden die mit Mastermix versetzten Proben für 10

Minuten bei 25°C und im Anschluss für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine 5-minütige Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 85°C. Zuletzt wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. Die fertig umgeschriebene cDNA wurde von 25 ng/µl mit RNase freiem Wasser auf 5 ng/µl verdünnt und bis zur Verwendung für die PCR und Real time PCR bei minus 20°C gelagert.

2.2.7 Aufbereitung von Zelllysaten zur Untersuchung mittels PCR

Zur Aufbereitung von Zelllysaten wurde die Aufreinigung mit Trizol mit dem RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen kombiniert. Die zu analysierenden Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen kultiviert bis sie zu ca. 90% konfluent waren. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen zunächst in der Flasche mit 1 ml Trizol lysiert. Danach konnten diese mit einem Plastischaber vollständig vom Flaschenboden gelöst werden. Mit den in Trizol suspendierten Zellen wurde dann wie Kapitel 2.2.6 beschrieben verfahren. Nach der 10-minütigen Inkubation mit Isopropanol wurde die Behandlung mit dem RNeasy Plus Mini Kit fortgesetzt. Die Proben wurden in die RNeasy Mini Spin Columns überführt und zunächst 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Es folgten mehrere Waschschriffe mit den im Kit enthaltenen RW1- und RPE-Puffern. Zum Schluss wurde die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser aus den Säulen eluiert.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop photometrisch bestimmt. Bei geeigneter Qualität der RNA folgte der DNase-Verdau und die cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.8 PCR

Um die optimale Annealingtemperatur der verwendeten Primer zu ermitteln, wurde eine PCR mit Temperaturgradienten durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls überprüft, ob mit dem gewählten Primer-Sonden-System bei

geeigneter Annealingtemperatur ein spezifisches PCR-Produkt der richtigen Größe amplifiziert werden konnte. Dazu wurden Annealingtemperaturen zwischen 50,6°C und 62,6°C getestet. Die klassische PCR besteht aus drei wichtigen Schritten: der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, der Anlagerung der Primer (Annealing) und der Synthese eines neuen DNA-Doppelstranges (Elongation). Durch die zyklische Wiederholung dieser 3 Schritte findet eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten Zielsequenz statt. Diese Schritte wurden mit Hilfe eines programmierbaren Thermocyclers durchlaufen und die temperaturstabile Go Taq DNA Polymerase von Promega verwendet. Zunächst wurde der Mastermix nach der unten aufgeführten Zusammensetzung angesetzt.

Mastermix:

Nuklease freies Wasser	34,25 µl
Go Taq Flexi Buffer	10 µl
Magnesiumchlorid, 25 mM	2 µl
dNTPs, 10 mM	1 µl
forward primer	1 µl
reverse primer	1 µl
Go Taq DNA Polymerase	0,25 µl

Die zur Ermittlung der Annealingtemperatur verwendete cDNA stammte aus dem Gyrus postcentralis eines Menschen. Für jeden Ansatz wurden 5 ng cDNA in einem Volumen von 1 µl mit 49,5 µl Mastermix versetzt. Das verwendete PCR-Programm lautete wie folgt.

PCR-Protokoll:

Initiale Denaturierung	95°C	1 Min.	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 Sek.	38 Zyklen
Annealing	Temperaturgradient	45 Sek.	38 Zyklen
Elongation	72°C	45 Sek.	38 Zyklen
Finale Elongation	72°C	10 Min.	1 Zyklus

Unmittelbar nach der PCR wurden die bei den unterschiedlichen Annealingtemperaturen entstandenen DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Bei der elektrophoretischen Auftrennung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle entlang eines elektrischen Feldes zur positiv geladenen Anode. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch die Gelmatrix als größere. Anhand einer DNA-Leiter kann dann die Anzahl der Basenpaare abgelesen werden, aus der das DNA-Fragment besteht. Zur Auftrennung wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 200 ml TBE (1x) mit 4g Agarose 3-mal in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurde zur Sichtbarmachung der DNA 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben, welches nach Interkalation in die DNA-Doppelhelix unter UV-Licht fluoresziert. Zum Auskühlen wurde das Gel in einen Träger gefüllt und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach einer Trocknungszeit von 30 Minuten wurden die Proben in einer mit TBE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer von Biometra auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 120 Volt 30 Minuten lang aufgetrennt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems von VWR unter UV-Licht visualisiert und fotografiert (Abb. 5).

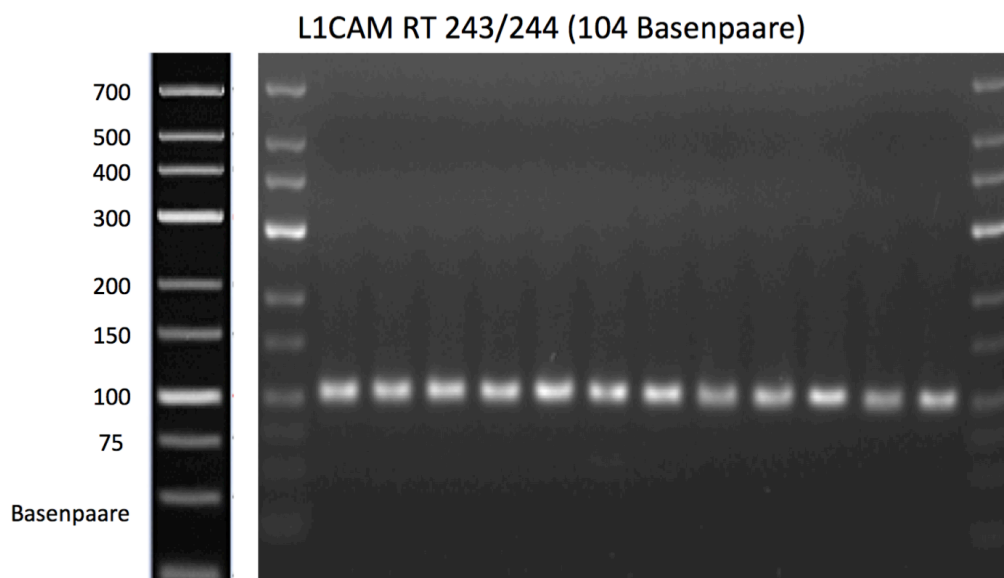


Abbildung 5: Beispiel eines 2%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels unter UV-Licht: Die bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen mit der Go Taq DNA Polymerase von Promega und dem L1CAM Primerpaar RT 243/244 umgeschriebenen Proben zeigen alle je eine deutliche Bande auf der richtigen Höhe (104 Basenpaare).

2.2.9 qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) konnte die Menge an mRNA, die zuvor durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, bestimmt werden. Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung und Charakterisierung der entstehenden DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das Light Cycler System von Roche benutzt. Der Mastermix dieser Firma enthält den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I. Dieser fluoresziert sobald er in die doppelsträngige DNA eingelagert ist und durch UV-Licht angeregt wird. Die Stärke des vom Light Cycler detektierten Fluoreszenzsignals korreliert quantitativ mit der entstehenden doppelsträngigen DNA. Trägt man die Intensität der Fluoreszenz graphisch gegen die Anzahl der Reaktionszyklen auf erhält man eine Amplifikationskurve (Abb. 6, A). Diese Kurve hat einen typischen Verlauf mit 4 verschiedenen Phasen: die Anfangsphase, die Phase des exponentiellen Wachstums, die Log-Phase und die Plateauphase. Die relative Quantifizierung erfolgt durch die Bestimmung der Anzahl der Reaktionszyklen, die erfolgen müssen um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, das einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert der sogenannte Ct-Wert (cycle threshold) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant das Hintergrundsignal überschreitet und wird von der Light Cycler Software berechnet. Je früher der Ct-Wert gemessen wird, desto mehr cDNA war ursprünglich vorhanden. Um Varianzen im Versuchsablauf auszugleichen, wurde bei jedem Ansatz der Ct-Wert des Zielgens durch den Ct-Wert des Referenzgens Cyclophilin B dividiert. Der Quotient gab Auskunft über die relative Expression (Abb. 6, B) des Zielgens. Dabei wurde von einer gleichmäßigen Expression des Referenzgens ausgegangen, da das Protein in fast allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Im Anschluss an die Amplifikation wurde die Spezifität des Fluoreszenzsignals in einer Schmelzkurvenanalyse (Abb. 6, C) überprüft. Anhand der Länge des DNA-Doppelstranges und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur konnte jedes Amplifikat auf seine Spezifität hin kontrolliert werden. Die qRT-PCR-Reaktionen wurden in 96-well-Platten durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 25ng cDNA (in 5µl Volumen) mit 3 µl Nuklease freiem Wasser, je 1 µl forward- und reverse-Primers sowie 10µl Mastermix (Light Cycler

480 SYBR Green I) vermischt. Zur Kontrolle auf DNA/cDNA-Kontaminationen wurde bei jedem Versuchsansatz eine ohne reverse Transkriptase umgeschriebene Probe und eine Probe mit Nuklease freiem Wasser mitgeführt. Zuletzt wurde die 96-well-Platte mit einer Klebefolie versehen und kurz zentrifugiert. Danach erfolgte die qRT-PCR nach dem unten aufgeführten Cyclers-Programm.

Cycler-Programm:

qRT-PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5 Minuten	1
PCR	95°C	10 Sekunden	50
	62°C	15 Sekunden	
	72°C	15 Sekunden	
Schmelzkurve	95°C	5 Sekunden	1
	65°C	1 Minute	
	97°C	0,1°C/Sekunde ansteigend	
Kühlung	40°C	30 Sekunden	1

qRT-PCR mit NrCAM RT 267/268

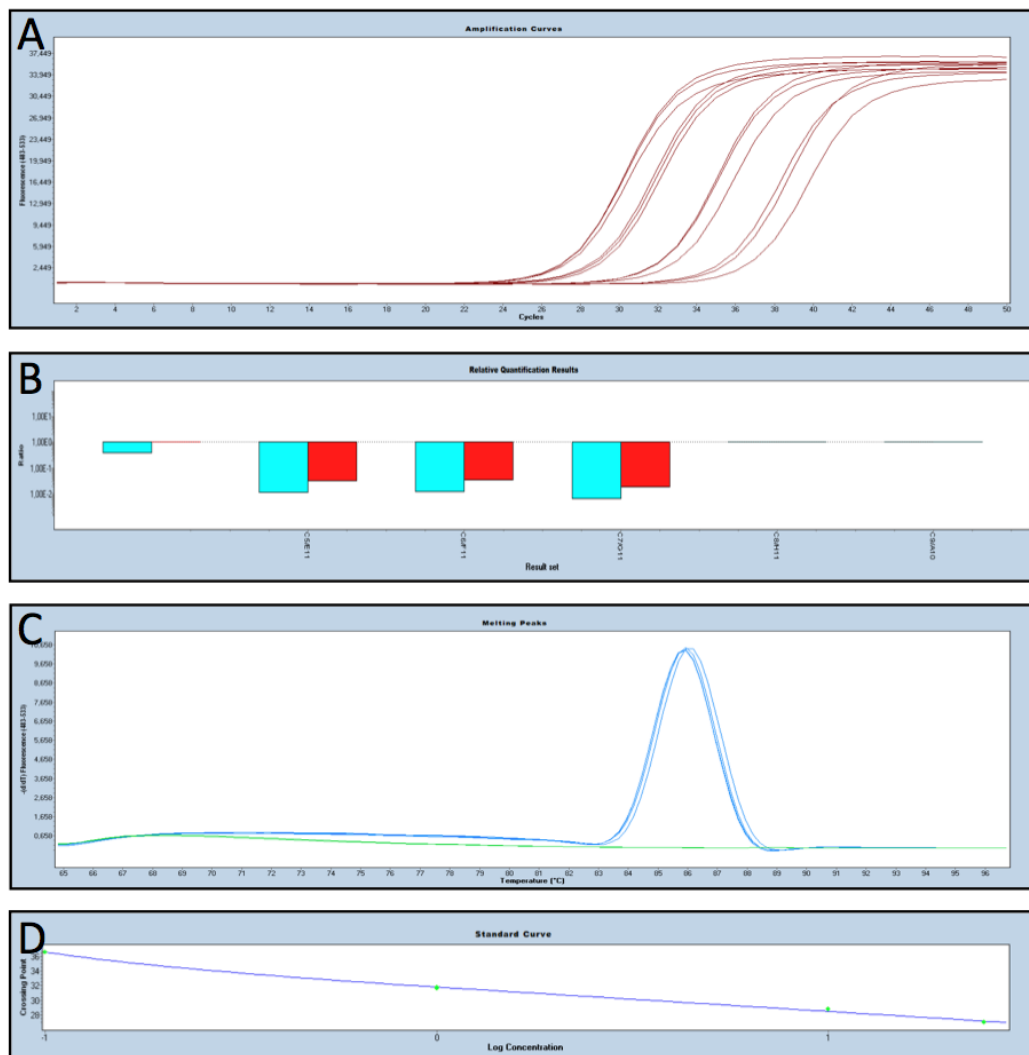


Abbildung 6: Beispielgraphen für eine mit NrCAM RT 267/268 und Light Cycler 480 SYBR Green I Mastermix durchgeführte qRT-PCR: A=graphische Darstellung der Amplifikationskurven; B=graphische Darstellung der relativen Quantifizierung: die blauen Graphen stellen die Expression von Cyclophilin B und die roten Graphen die Expression von NrCAM dar, die beiden letzten Graphenpaare repräsentieren die Kontrollen auf Kontamination bzw. fehlerhafte Umschreibung; C=graphische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse; D= Standardkurve (mit Hilfe der Light Cycler Software von Roche erstellt)

Um die Menge an mRNA, die zuvor durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, objektiv ermitteln zu können, wurde zusätzlich die Effizienz der verwendeten Primer bestimmt und in die Berechnung einbezogen. Hierfür wurde mit der Verdünnungsreihe (25ng/μl bis 0,00001ng/μl) einer Probe eine qRT-PCR durchgeführt. Die entstandene DNA wurde anschließend absolut quantifiziert und eine Standardkurve (Abb. 6, D) erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte die Effizienz des Primers errechnet werden. Die Effizienz des Primers wurde im Anschluss bei der relativen Quantifizierung berücksichtigt.

2.3 Zellbiologische Untersuchungen

Mit der Kultivierung von Zellen wurde zum einen gearbeitet, um Zelllysate für die molekularbiologischen Untersuchungen herstellen zu können. Zum anderen dienten die zellbiologischen Untersuchungen den funktionellen Analysen. Um die Spezifität der Schwannzell-Migration zu erforschen, wurden Migrationsassays durchgeführt. Der Einfluss von NrCAM und L1CAM auf die Interaktion zwischen hSC und PCC wurde mit Hilfe von Adhäsions- und Migrationsassays untersucht.

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, SU86.86 und T3M4 verwendet. Des Weiteren wurden die Glioblastomzellen Ln-229, humane Schwannsche Zellen (hSC), die Fibroblasten BJ und pankreatische Stellatumzellen (PSC) kultiviert. Alle Zelllinien außer den hSC und den PSC wurden ursprünglich über die American Type Culture Collection erworben. Die hSC wurden von ScienCell bezogen und die PSC wurden aus dem Pankreasgewebe von Ratten isoliert. Alle verwendeten Zellen wachsen als adhärente Einzelschicht, auch Monolayer genannt. Auf weitere Eigenschaften der Zellen und deren Ansprüche bezüglich des Mediums wurde bereits im Materialteil der Arbeit eingegangen.

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Alle drei Tage erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen ein Mediumwechsel. Davor wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf ihre Zelldichte und auf bakterielle und mykologische Kontaminationen untersucht. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90% passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 3 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA für 5 Minuten bis zur vollständigen Lösung vom Flaschenboden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Trypsin mit 9 ml Medium inaktiviert und die Zellen resuspendiert. Zuletzt wurden jeweils

2 ml Zellsuspension mit 8 ml frischem Medium in eine neue Flasche transferiert.

Zellen, die nicht bereits in Kultur vorhanden waren, wurden in einem möglichst kurzen Zeitraum aufgetaut und in 20 ml Medium gelöst. Im Anschluss wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in einer 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 3 bis 7 Tagen bildete sich ein dichter Zellrasen und die Zellen konnten subkultiviert werden.

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese nach Trypsinisierung und Bestimmung der Zellzahl 5 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nach einem Waschgang mit PBS in Gefriermedium resuspendiert. Das Gefriermedium setzte sich aus 90% FCS und 10% DMSO zusammen. DMSO verhindert beim Gefriervorgang die Bildung von Eiskristallen in den Zellen und damit deren Untergang. Da DMSO bei Raumtemperatur auf die Zellen toxisch wirkt, erfolgte das Aliquotieren und Einfrieren gleich im Anschluss an die Zugabe. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen in Kryoröhrchen überführt. Danach wurden die Aliquots mit jeweils 1 ml des zellhaltigen Gefriermediums über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Kryokontainern bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff umgelagert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Lösung wurden 40 µl entnommen und mit der gleichen Menge Trypanblau vermischt. Von dieser Mischung wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die vitalen Zellen in allen 4 Quadranten gezählt. Durch die Vitalfärbung mit Trypanblau konnten lebende Zellen deutlich erkannt werden, da diese den Farbstoff nicht aufnehmen oder ihn nach wenigen Sekunden wieder ausschleusen. Der Durchschnittswert aller vitalen Zellen pro ml Suspension wurde nach der unten aufgeführten Formel berechnet. „Z“ steht dabei für die Gesamtzahl der

vitalen Zellen in allen 4 Quadranten und „D“ repräsentiert den Verdünnungsfaktor, für den bei diesem Versuchsaufbau der Wert 2 einzusetzen ist.

Formel zur Berechnung der Zellzahl:

$$D \times (Z/4) \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.3.3 Isolation von pankreatischen Sternzellen aus der Ratte

Pankreatische Sternzellen der Ratte, auch myofibroblastäre Zellen des Pankreas genannt, wurden isoliert, um Zelllysate für die molekularbiologischen Untersuchungen zu gewinnen. Außerdem dienten die Zellen der Kokultivierung mit hSC im Migrationsassay. Die Technik der Isolation basiert auf bereits veröffentlichten Versionen (Apte, Haber et al. 1998; Bachem, Schneider et al. 1998). Zur Isolation der pankreatischen Sternzellen aus einer Ratte erfolgte zunächst die Entnahme des Pankreas unter sterilen Bedingungen. Es wurde ein längs verlaufender Bauchschnitt mit 2 seitlichen Entlastungsschnitten angelegt und nach Durchtrennung von Ösophagus und Rektum der Intestinaltrakt vollständig entnommen. Danach erfolgte unter dem Mikroskop die Präparation des Pankreas. Die Bauchspeicheldrüse der Ratte befindet sich zwischen Magen, Milz und Dünndarm. Nach der Entfernung des Fettgewebes wurde das Gewebe in möglichst kleine Stücke geschnitten. Gleich im Anschluss wurden die Gewebestücke in einer mit Kollagenase versetzte HBSS-Lösung (10mg Kollagenase in 10ml HBSS) 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach der chemischen Dissoziation erfolgte eine mechanische Dissoziation mit Hilfe einer 10 ml Spritze. Danach wurde die dissoziierte Suspension filtriert und 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3.4 Lebendzellfärbung mit CFDA

Die Lebendzellfärbung wurde mit dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit von Invitrogen durchgeführt. Zunächst wurde die Färbelösung nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Die zu färbenden Zellen wurden gezählt und die gewünschte Anzahl in einem Falcon 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschrift mit PBS. Danach wurden die Zellen wieder in 2 ml PBS resuspendiert, 1 μ l Färbelösung dazugegeben und kurz gevortext. Anschließend wurden die Zellen in der Färbelösung 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um den Farbstoff, der im Laufe der Inkubationszeit nicht von den Zellen aufgenommen wurde, wieder zu neutralisieren, wurden die Zellen nach einem weiteren Zentrifugierschritt in FCS-haltigem Medium resuspendiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen in FCS-haltigem Medium resuspendiert und für die Versuche verwendet werden.

2.3.5 Adhäsionsassay

Der Versuchsaufbau des hier beschriebenen Adhäsionsassays basiert auf einer bereits veröffentlichten Version, in der als Bindungspartner der Zellen die mit Substrat beschichtete Bodenplatte einer 96-well-Platte dient (Issa, Nummer et al. 2009). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde der Boden einer 96-well-Platte mit hSC beschichtet und deren Adhäsion an PCC untersucht. Die Analysen wurden mit zwei verschiedenen Karzinomzelllinien (SU86.86 und MiaPaCa-2) durchgeführt.

Etwa 3 Tage vor dem Versuchsbeginn wurden hSC auf einer 96-well-Platte ausgesät. Dabei wurden 6000 hSC (in 200 μ l Medium)/well verwendet und darauf geachtet, dass die Verteilung auf der Platte ein übersichtliches Arbeiten ermöglichte (Abb. 7).

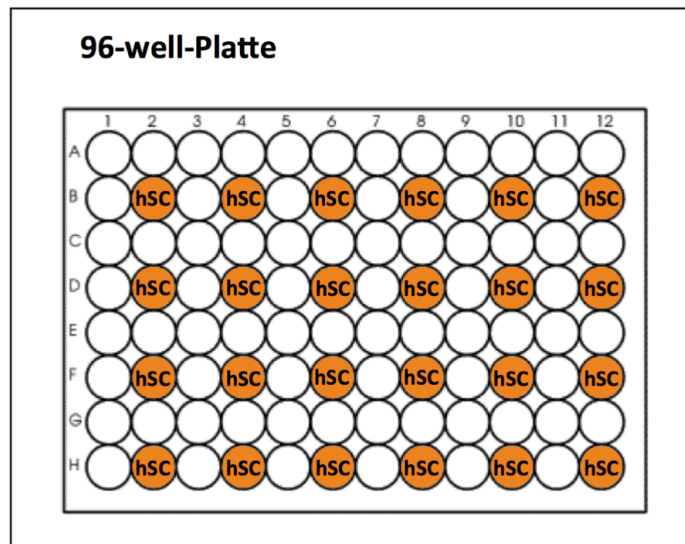


Abbildung 7: schematische Darstellung einer mit hSC beschichteten 96-well-Platte

Nach etwa 3 Tagen Inkubation im Brutschrank hatte sich in allen wells ein einheitlicher und dichter Zellrasen gebildet. Erst unter dieser Voraussetzung wurde mit dem eigentlichen Versuch begonnen. Bei jedem Versuchsdurchlauf wurden 3 verschiedene Ansätze angefertigt. Bei einem Ansatz wurden nur die hSC mit dem Antikörper behandelt und bei einem nur die Pankreaskarzinomzellen SU86.86 bzw. MiaPaCa-2. Im dritten Ansatz wurden sowohl die hSC als auch die PCC einer Antikörperbehandlung unterzogen.

Zur Antikörperbehandlung der hSC wurde zunächst das alte Medium abgenommen und anschließend jedes well einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Zellrasen jedes wells mit 50 µl Antikörperlösung bedeckt. Für die Analysen mit NrCAM wurde anti-NrCAM von Abcam (1:100 in FCS-freiem Medium) verwendet. Für die Assays mit L1CAM wurde anti-L1CAM (Nr.1, 2, 3, 4 und 7, freundlicherweise von Prof. Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt; 1:100 in FCS-freiem Medium) verwendet. Für die Negativkontrolle wurde eine Antikörperlösung mit Mouse IgG1 Isotype Control und Rabbit Isotype Control von Invitrogen (1:100 in FCS-freiem Medium) angesetzt. Die Antikörperlösungen verblieben eine Stunde bei 37°C auf den hSC. Nach einem Waschgang mit PBS waren die wells dann für die Inkubation mit den PCC vorbereitet.

Um die Antikörperbehandlung der PCC durchführen zu können, wurden diese zunächst in 75 cm² Zellkulturflaschen angezüchtet. Bei einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Hilfe der enzymfreien Cell

Dissociation Solution von Sigma vom Flaschenboden gelöst. Hierfür wurden die Zellen mit 5 ml der Dissoziationslösung benetzt und für 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Auf eine Trypsinisierung wurde in diesem Fall verzichtet um eine negative Beeinflussung der Antikörperblockade zu vermeiden. Nach der Inkubationszeit wurden die losgelösten Zellen in 5 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert und gezählt. Für jede Antikörperbehandlung wurden 1×10^6 Zellen aliquotiert und 5 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Es wurde ein Überschuss an Zellen für die Antikörperbehandlung aliquotiert, um die Verluste durch die zahlreichen Waschschrte des Analyseprotokolls auszugleichen zu können. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in FCS-freiem Medium resuspendiert. Anschließend wurde der betreffende Antikörper zugegeben (1:100) und die Zellen kurz gevortext. Zur Antikörperbehandlung der PCC wurden ebenfalls die im obigen Abschnitt bereits aufgeführten Antikörper in der gleichen Konzentration verwendet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA gefärbt. Nach der Färbung wurden die Krebszellen nochmal gezählt.

Im Anschluss an die Antikörperbehandlung der Zellen wurde die Krebszellsuspension auf die in den wells befindlichen hSC aufgebracht. Hierfür wurden jeweils 3000 Krebszellen/well in 200 µl FCS-haltigem Medium gelöst und auf die hSC pipettiert. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde die Krebszellsuspension vorsichtig abgesaugt und durch 2-maliges Waschen mit PBS nicht adhärierte Krebszellen aus den wells entfernt.

Zuletzt wurden die Zellen mit Formalin auf der Platte fixiert und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Abb. 8, A bis C). Von jedem well wurde für eine objektive Analyse mittels ImageJ eine Übersichtsaufnahme bei zehnfacher Vergrößerung angefertigt (Abb. 8, A). Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CFDA wurde eine spezifische Färbung der Krebszellen erreicht und damit eine klare Differenzierung zwischen hSC und PCC möglich. In Abb. 8, D wird die spezifische Färbung durch die Überlagerung einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme der gleichen Stelle verdeutlicht. Die spindelförmigen ungefärbten hSC im Hintergrund sind deutlich von den fluoreszenzgefärbten Krebszellen im Vordergrund abzugrenzen.

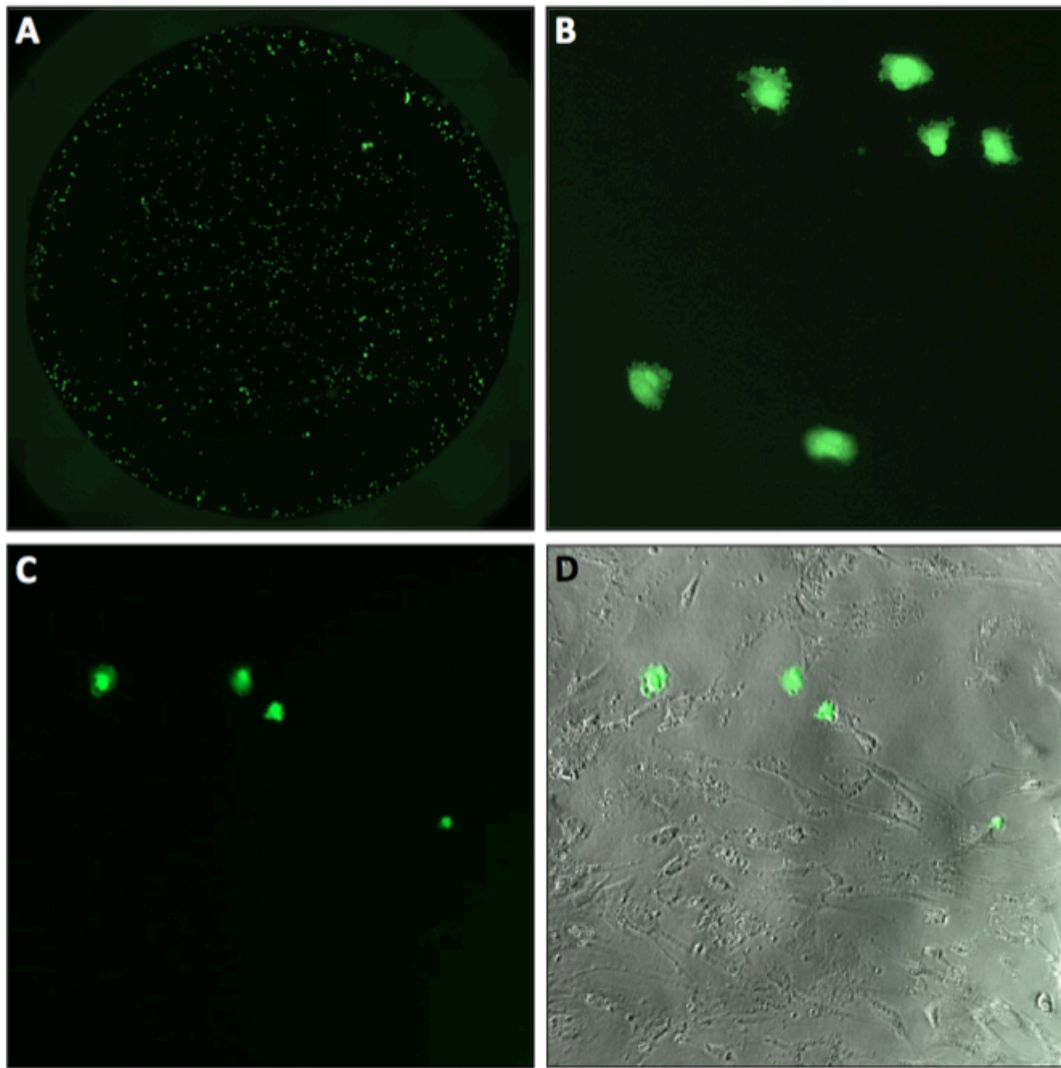


Abbildung 8: Beispielbilder eines Adhäsionsassays mit SU86.86: A=Übersichtsbild eines wells, B+C=Nahaufnahme fluoreszenzgefärbter SU86.86 im well; D=Überlagerung einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme der gleichen Stelle wie Abb. 8, C

Die computergestützte Auswertung der Übersichtsbilder wurde mit ImageJ durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Originalbild mit ImageJ geöffnet (Abb. 9, A) und in ein 8-Bit Dateiformat umgewandelt. Am Rand des wells zeigte sich bei nahezu allen Versuchen eine vermehrte Ansammlung von Zellen. Dies wurde zum einen darauf zurückgeführt, dass der Waschvorgang an dieser Stelle nicht effektiv genug war. Zum anderen wuchsen die hSC im Randbereich des wells schlecht an und es kam dadurch in dieser Region zu einer vermehrten Adhäsion der Krebszellen. Deshalb wurde der Rand der wells bei allen Analysen ausgeschlossen. Zu diesem Zweck wurde auf dem Bild ein Kreis so positioniert, dass der zellreiche Rand des wells auf die Breite von etwa einem Zentimeter

ausgeschlossen war (Abb. 9, B). Anschließend wurde der Außenbereich des Kreises entfernt (Abb. 9, C). Danach konnte mit der Funktion „find maxima“ die „noise tolerance“ so eingestellt werden, dass das Programm ausschließlich die fluoreszierenden Krebszellen zählte (Abb. 9, D). Für die statistische Auswertung wurde der Quotient aus diesem Wert (entspricht den adhärenen Zellen) und den ursprünglich verwendeten 3000 Zellen/well gebildet. Dieser Quotient ergab die prozentuale Adhäsion der Zellen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen.

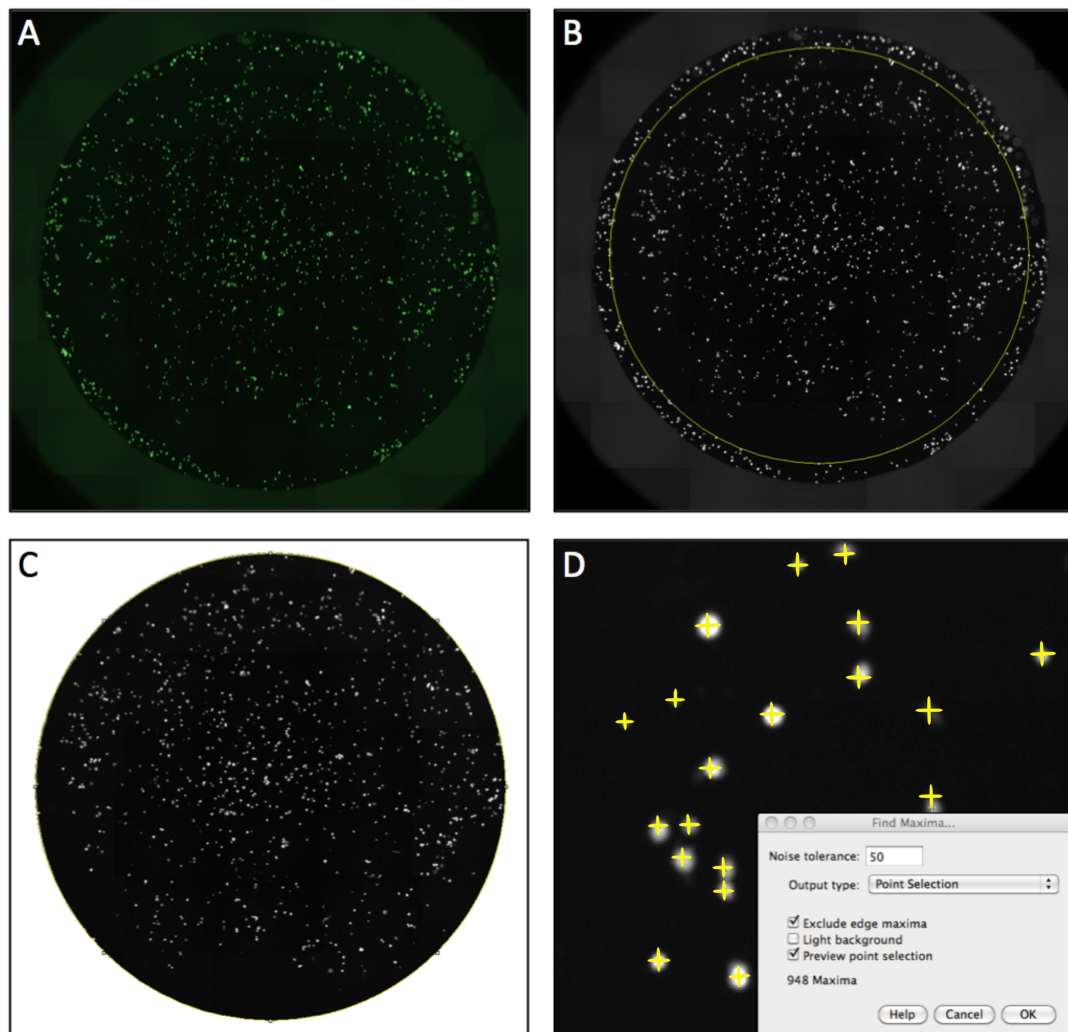


Abbildung 9: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Adhäsionsassays mittels ImageJ: A=Originalbild eines wells; B=Positionierung des Kreises; C=Übersichtsbild des wells nach der Entfernung des Randbereichs; D=Einstellung der „noise tolerance“ zur Ermittlung der Zahl adhärierter Zellen pro well

2.3.6 3D in-vitro Migrationsassay

Die Durchführung des 3D in-vitro Migrationsassays beruht auf einer bereits veröffentlichten Version (Ceyhan, Demir et al. 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Versuchsansätze ausgearbeitet (Abb. 10 und 11).

Im ersten Ansatz wurde die hSC-Migration zu den Karzinomzellen durch ein ECM-Gel auf ihre Spezifität hin überprüft. Dafür wurden hSC mit PCC einerseits und mit PSC oder Ln-229 andererseits im Migrationsassay co-kultiviert (Abb. 10). Die im Migrationsassay verwendeten Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz etwa 100% angezüchtet. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, trypsinisiert und gezählt. Für jeden ECM-Gelkreis wurden 1×10^5 Zellen in ein 1,5 ml Tube transferiert und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Zellpellet in 25 µl ECM-Gel von Sigma resuspendiert. Als erstes wurde der mittlere Gelkreis, bei diesem Ansatz der Gelkreis mit den hSC, auf eine 10 mm Petrischale mit Glasboden pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C, um eine Polymerisation des Gels zu erreichen. Danach wurden die übrigen Gelkreise in exakt 1 mm Abstand zu dem mittleren Gelkreis auf die Petrischale pipettiert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich bei jedem Ansatz ein leerer Gelkreis ohne Zellen auf den Glasboden pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C wurden die Gelkreise durch 1 mm lange ECM-Brücken miteinander verbunden. Die Brücken sollten die Ausbildung eines Gradienten an Signalmolekülen zwischen den wechselwirkenden Zellen ermöglichen und zusätzlich eine zu überwindende Barriere für die zielgerichtete Migration der Zellen darstellen. Im Anschluss wurde das Gel zur Polymerisation nochmals für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden die Gelkreise mit 2 ml Neurobasalmedium bedeckt. Das Medium wurde vor dem Gebrauch mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2% B-27 Supplement versetzt.

Nach 12 Stunden im Inkubator wurde dem Medium zur Konstanthaltung des pH-Wertes Hepes-Puffer (25µl/ml Medium) zugegeben. Gleich im Anschluss wurden die Migrationsfronten der hSC (bei dem hier beschriebenen Ansatz drei) 24 Stunden lang mit einem invertierten und einer Kamera ausgestatteten Lichtmikroskop gefilmt. Hierfür wurde alle 15 Minuten ein Bild von den verschiedenen Fronten gemacht (sogenannte „Time Lapse“-Mikroskopie). Diese Bildsequenz

wurde mit Hilfe der Computersoftware ImageJ ausgewertet.

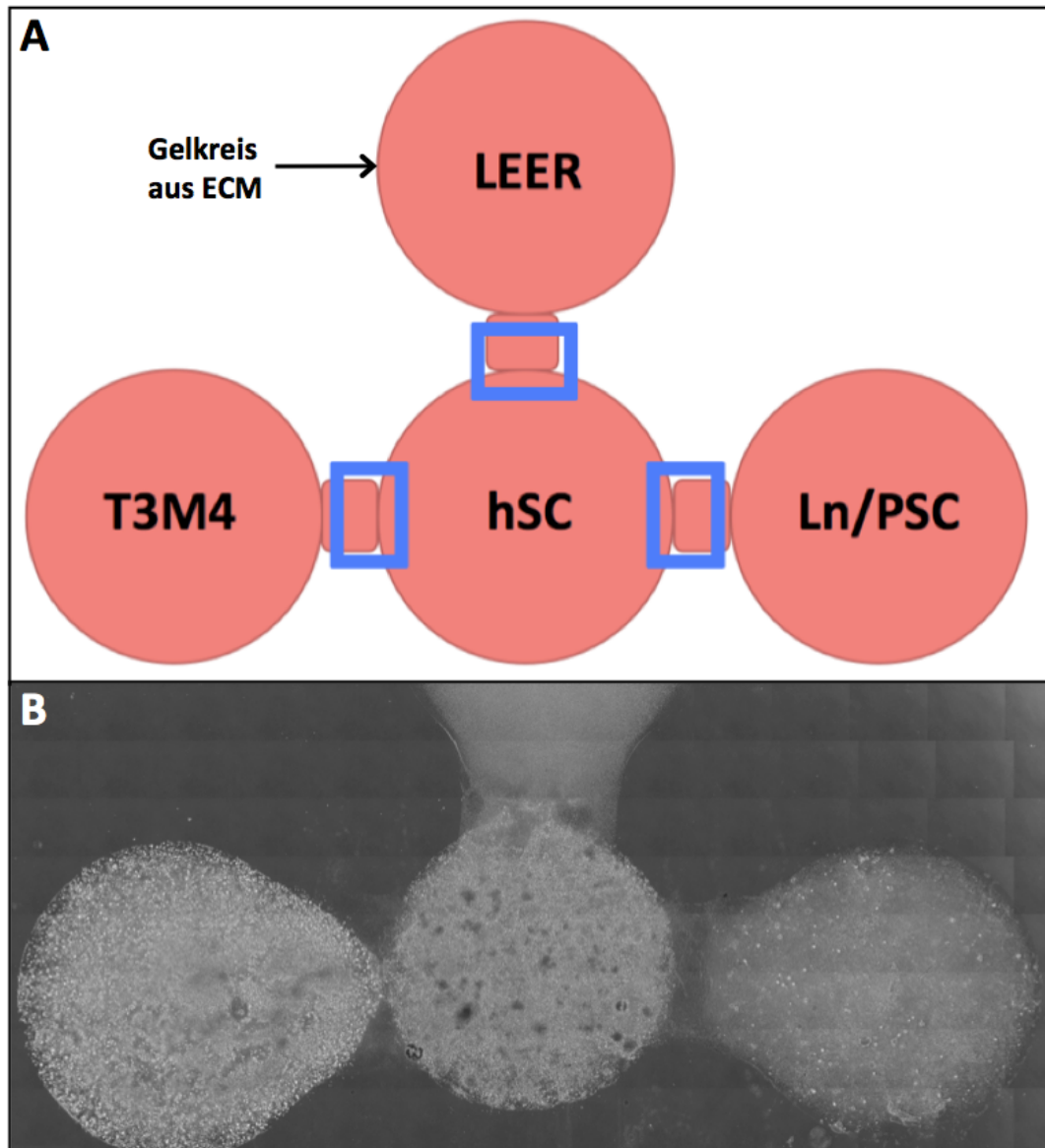


Abbildung 10: erster Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration: A=schematische Darstellung des Ansatzes, die Rechtecke symbolisieren den gefilmten Ausschnitt der Migrationsfront; B=Übersichtsaufnahme des Ansatzes in vitro (40 Stunden nach dem Ansetzen des Versuches)

Im zweiten Ansatz wurde mit antikörperbehandelten hSC (Abb. 11, A+B) gearbeitet und im dritten Ansatz mit antikörperbehandelten SU86.86 (Abb. 11, C+D). Der Versuchsablauf dieser beiden Ansätze unterschied sich allein durch die Vorbehandlung mit den Antikörpern und die Anzahl der Gelkreise von dem im oberen Abschnitt beschriebenen. Diese Vorbehandlung wurde wie in Kapitel 2.3.5 bei der Antikörperbehandlung der PCC beschrieben durchgeführt. Es wurde anti-

L1CAM (Nr. 4; 1:100 in FCS-freiem Medium) verwendet. Für die Negativkontrolle wurde eine Antikörperlösung mit Mouse IgG1 Isotype Control und Rabbit Isotype Control von Invitrogen (1:100 in FCS-freiem Medium) angesetzt.

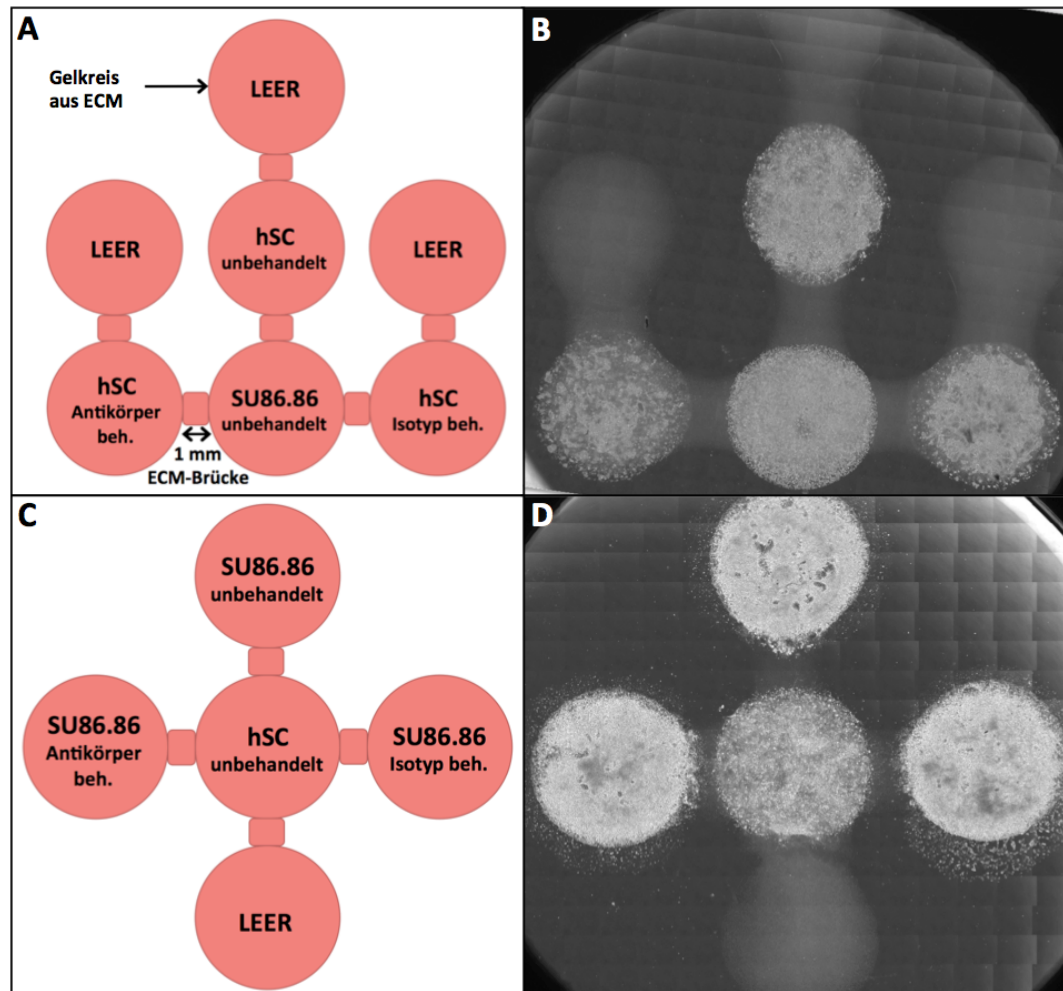


Abbildung 11: zweiter und dritter Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit Antikörperblockade: A=schematische Darstellung des zweiten Ansatzes mit antikörperbehandelten hSC; B=Übersichtsaufnahme des zweiten Ansatzes in vitro (30 Stunden nach dem Ansetzen des Versuches); C=schematische Darstellung des dritten Ansatzes mit antikörperbehandelten SU86.86; D=Übersichtsaufnahme des dritten Ansatzes in vitro (50 Stunden nach dem Ansetzen des Versuches)

Die Auswertung des Migrationsassays erfolgte mit Hilfe der Computersoftware ImageJ. Zunächst wurde die auszuwertende Bildsequenz im TIFF-Format hochgeladen (Abb. 12, A). Anschließend wurden mit der Hilfe des Plugins „Manual Tracking“ insgesamt 30 Zellen der hSC-Migrationsfront auf ihrem Weg durch die ECM-Brücke verfolgt (Abb. 12, C). Dazu mussten zuvor einige Parameter, wie z.B. das Zeitintervall zwischen den einzelnen Bildern definiert werden (Abb.

12, B). Nachdem die Migration einer Zelle vollständig dokumentiert worden war, konnte mittels der Funktion „Ad Track“ mit der Aufzeichnung der nächsten Zelle begonnen werden (Abb. 12, B: siehe Pfeil). Die Migrationskoordinaten, die zurückgelegte Distanz und die Geschwindigkeit jeder der 30 Zellen wurde vom Programm aufgezeichnet (Abb. 12, D). Anschließend konnten diese Daten in einer Excel-Tabelle abgespeichert werden.

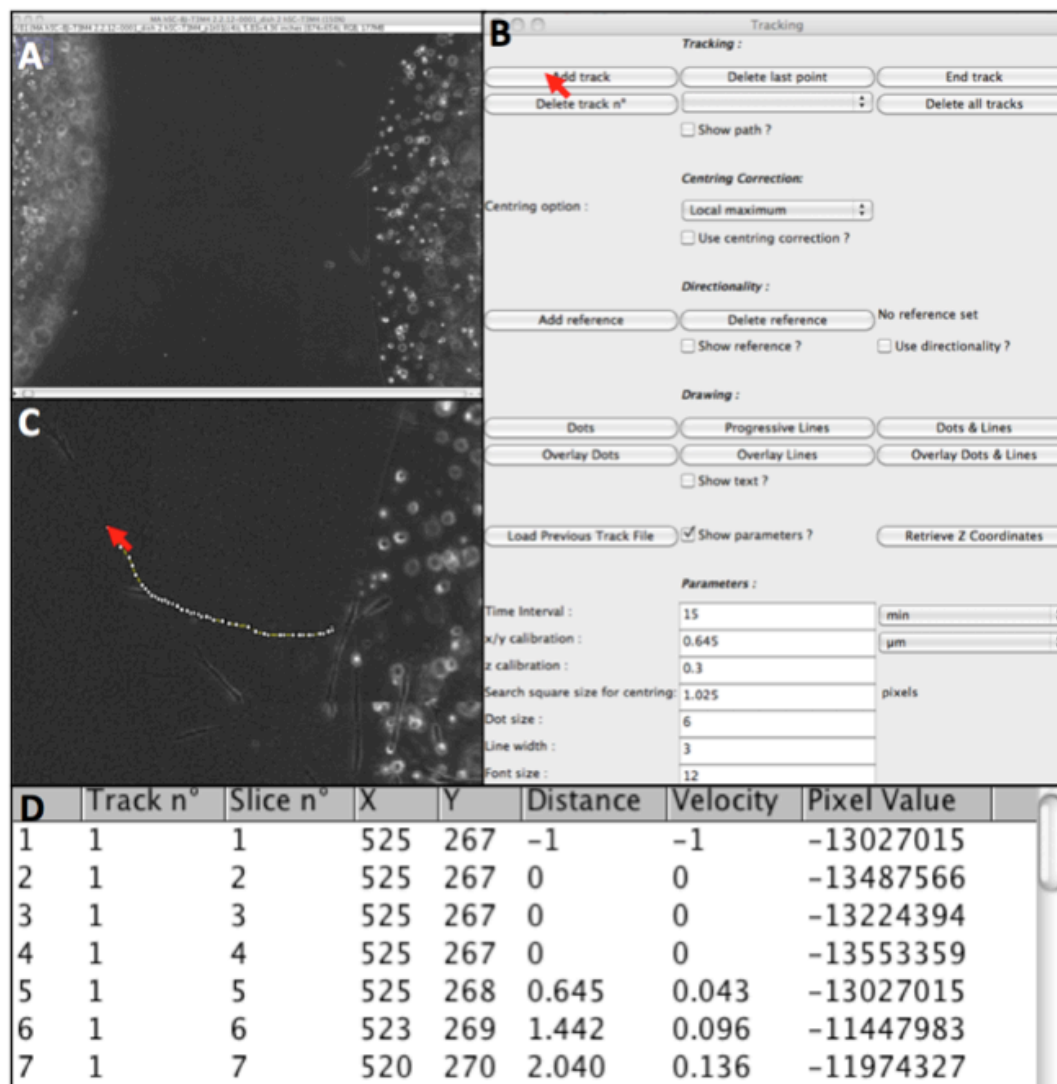


Abbildung 12: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Migrationsassays mittels ImageJ („Manual Tracking“): A=zu analysierende Bildsequenz der Migrationsfront; B=Einstellung der gewünschten Parameter; C=Verfolgung der Migration einer Zelle durch die ECM-Brücke mit der Maus; D=vom Programm aufgezeichnete Ergebnisse der Analyse

Danach wurden die bereits abgespeicherten Daten mit Hilfe des Plugins „Chemotaxis Tool“ für die statistischen Analysen weiter bearbeitet. Zunächst wurde die Excel-Tabelle importiert (Abb. 13, A). Nach Eingabe des Zeitintervalls

und der X/Y-Kalibration konnten mit der Hilfe des Programms folgende Parameter für die statistischen Analysen errechnet werden (Abb. 13, B): die zurückgelegte Distanz der Zelle, die Geschwindigkeit der Migration, die Direktionalität der Migration und der FMI („Forward Migration Index“).

Die zurückgelegte Distanz jeder einzelnen Zelle wurde als euklidische Distanz angegeben. Unter euklidischer Distanz wird in diesem Zusammenhang der geradlinige Abstand bzw. die Luftlinienentfernung zwischen dem Anfangspunkt und dem Endpunkt jeder einzelnen Zelle verstanden (Royer 2001). Die Geschwindigkeit der Migration ist die zelluläre Durchschnittsgeschwindigkeit jeder einzelnen Zelle. Die Direktionalität liefert ein Maß dafür, wie gerichtet die Bewegung der Zelle abläuft. Sie ergibt sich aus dem Quotienten aus euklidischer Distanz und akkumulierter Distanz. Der FMI zeigt wiederum an, mit welcher Tendenz sich eine Zelle in eine bestimmte Richtung bewegt.

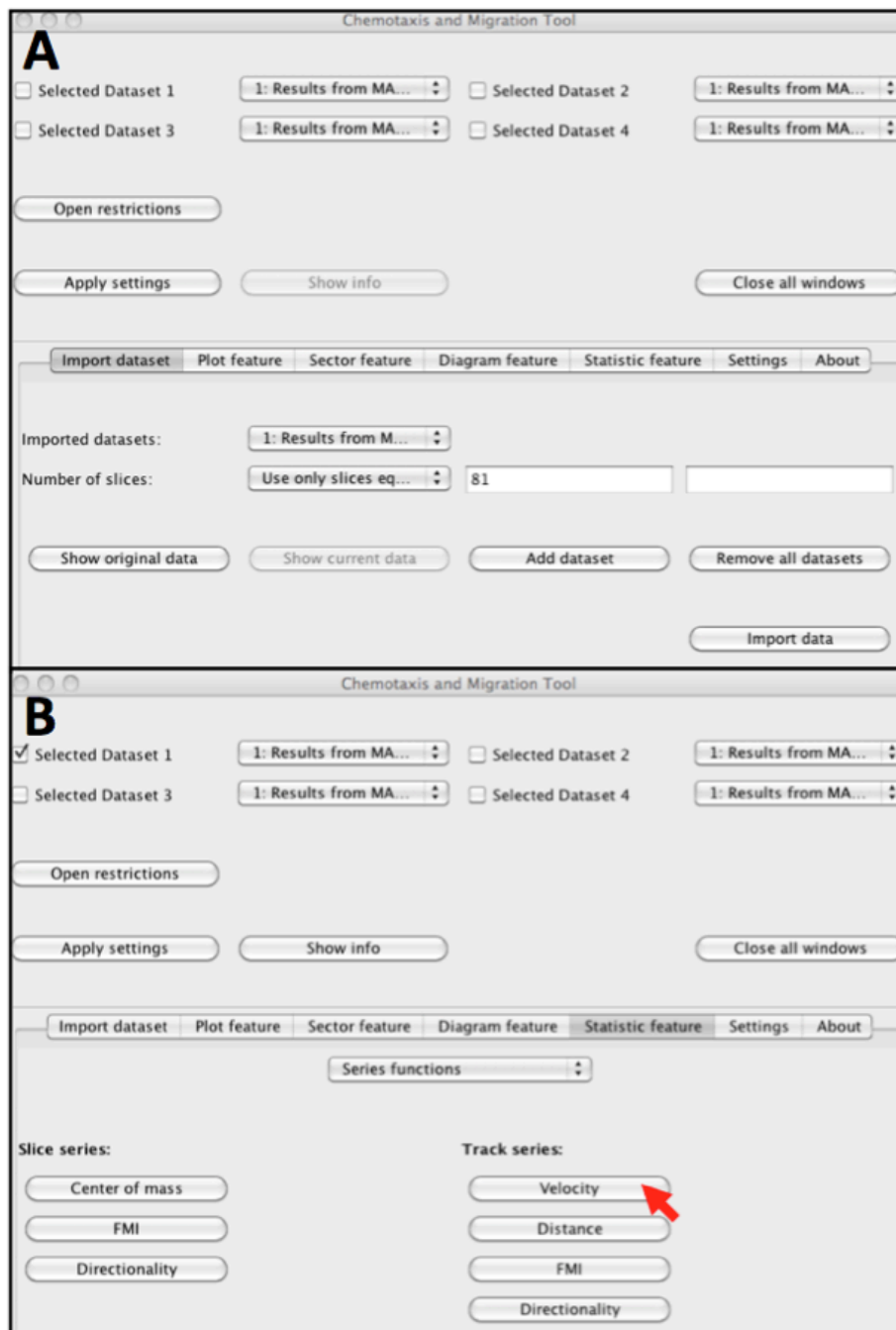


Abbildung 13: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Migrationsassays mittels ImageJ („Chemotaxis Tool“): A=Importieren der Ergebnisse der ausgewerteten Bildsequenz; B=Abruf der Parameter für die statistischen Analysen, siehe Pfeil

2.4 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (“standard error of the mean”) berechnet. Für den Vergleich nicht-parametrischer Werte zweier Gruppen wurde der

U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Zum Vergleich nicht-parametrischer Werte zwischen mehr als 2 Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Im Rahmen der Varianzanalyse wurde der Kruskal-Wallis-Test und der Dunn's Test durchgeführt. Für alle statistischen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Ein Unterschied mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ wurde als signifikanter angesehen und $p < 0,001$ als hoch signifikanter Unterschied beschrieben.

V ERGEBNISSE

1 Expressionsprofil der CAMs auf den hSC

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden schon eine Reihe von Zelladhäsionsmolekülen, darunter auch NrCAM und L1CAM auf den Schwannschen Zellen identifiziert. Deren Einfluss auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom war bisher jedoch völlig unbekannt. Als Grundlage für die Erforschung der Relevanz der beiden Zelladhäsionsmoleküle in diesem Zusammenhang wurde erstmals ein detailliertes Expressionsprofil erarbeitet.

1.1 Basisexpressionsprofil von NrCAM

Um die Lokalisation von NrCAM im normalen Pankreasgewebe und im Pankreaskarzinomgewebe genau definieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Gegenfärbung angefertigt (Abb. 14). Im normalen Pankreasgewebe zeigten viele Nerven und das Bindegewebe eine deutliche Immunoreaktivität. Die Nerven wiesen meist eine spezifische Färbung des Perineuriums auf (Abb. 14, A). Einige Nerven zeigten allerdings auch gar keine Immunoreaktivität. Zudem ließ sich das Oberflächenmolekül NrCAM deutlich im Bindegewebe zwischen den einzelnen Läppchen des Pankreas nachweisen (Abb. 14, B). Im Pankreaskarzinomgewebe färbten sich ebenfalls die Nerven und das Bindegewebe an. Die Immunoreaktivität des Bindegewebes im Karzinomgewebe war durch die prominenten desmoplastischen Reaktionen vorherrschend (Abb. 14, C und D). Die Immunoreaktivität des Bindegewebes schien am Übergang zu dem von den Karzinomzellen befallenen Pankreasgewebe am stärksten zu sein. Die Immunoreaktivität der Nerven war im Karzinomgewebe dagegen schwächer als im normalen Gewebe.

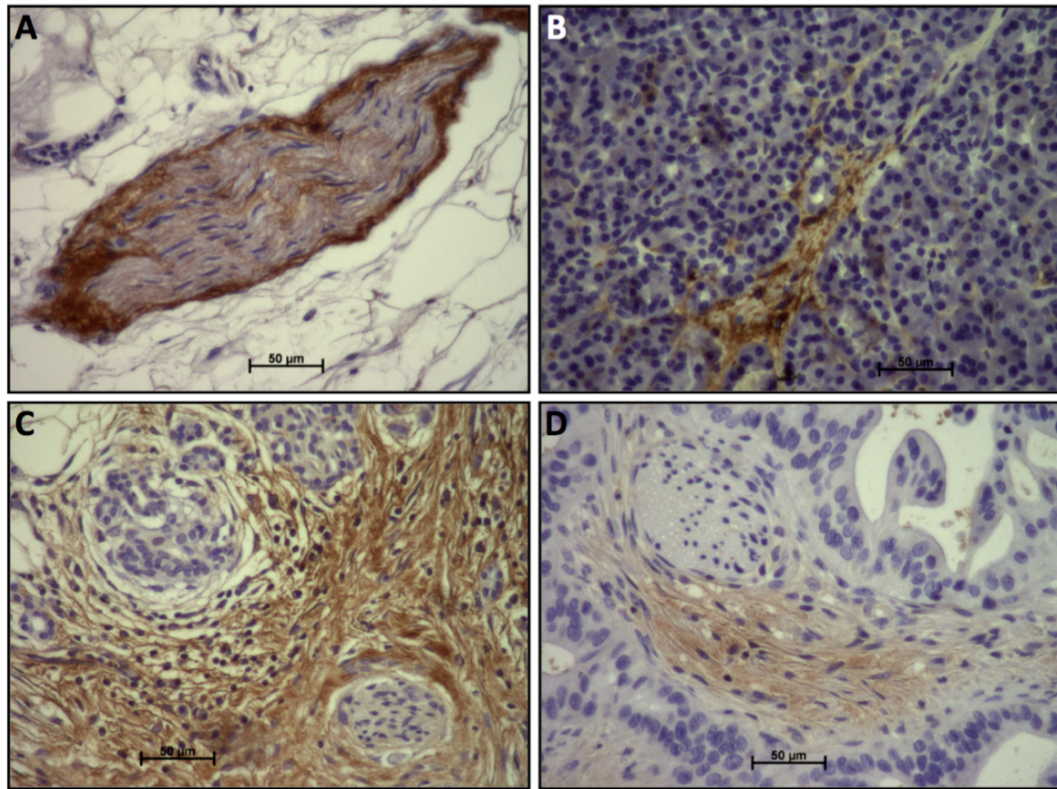


Abbildung 14: lichtmikroskopische Beispielbilder der mit anti-NrCAM behandelten Gewebe mit Gegenfärbung: A=normales Pankreasgewebe: deutliche Perineuriumsfärbung des Nerven; B=normales Pankreasgewebe: Bindegewebe angefärbt; C=PCa-Gewebe: starke Immunoreaktivität des Bindegewebes, der Nerv (unten rechts im Bild) ist schwach gefärbt; D=PCa-Gewebe: Bindegewebe angefärbt, keine Immunoreaktivität des Nerven (oben links im Bild)

Eine Untersuchung der Zelllysate unterschiedlicher Passagen mittels Western blot sollte Aufschluss über die Expression von NrCAM auf der Zelloberfläche der hSC geben. Zudem sollte die Existenz von NrCAM auf den im Rahmen dieser Arbeit kultivierten hSC bestätigt werden. Die Analyse ergab eine sehr gleichmäßige, von der Passage unabhängige Expression von NrCAM auf den untersuchten Zellen. In der Positivkontrolle konnte sowohl die α -Kette des Heterodimers bei 130 bis 140 kDa als auch die β -Kette bei 60 bis 80 kDa bestätigt werden (Abb. 15, A). Die Proben mit den hSC zeigten bei allen Passagen eine deutliche Bande auf der Höhe der β -Kette bei 60 kDa (Abb. 15). Die densitometrische Analyse (Abb. 15, B) bestätigte die augenscheinlich gleichmäßige Expression von NrCAM auf den hSC, unabhängig von der Passage (hSC P3: $0.42 \pm 0.02\%$, hSC P4: $0.46 \pm 0.01\%$, hSC P5: $0.43 \pm 0.23\%$, hSC P6: $0.45 \pm 0.01\%$, hSC P7: $0.48 \pm 0.02\%$).

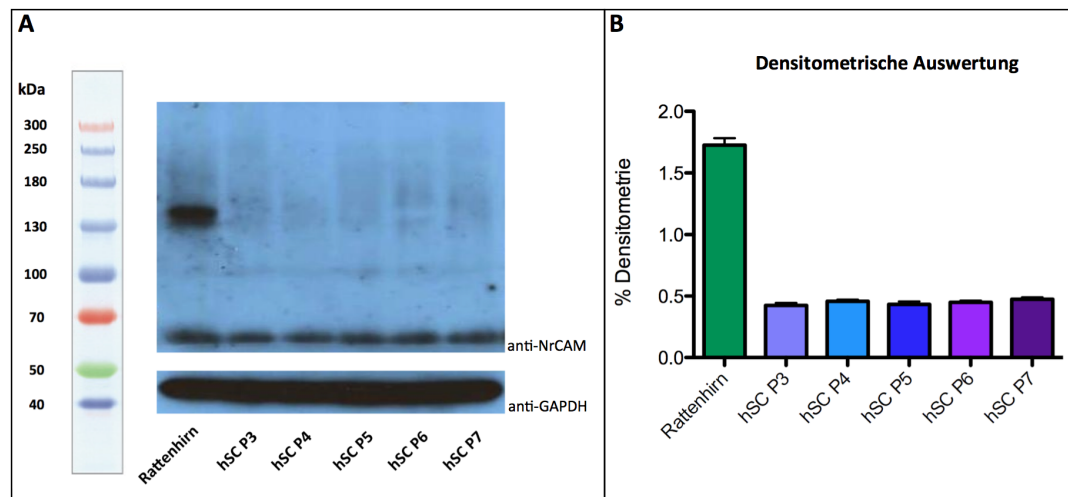


Abbildung 15: Untersuchung verschiedener Passagen hSC auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-NrCAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $1.73 \pm 0.06\%$, hSC P3: $0.42 \pm 0.02\%$, hSC P4: $0.46 \pm 0.01\%$, hSC P5: $0.43 \pm 0.23\%$, hSC P6: $0.45 \pm 0.01\%$, hSC P7: $0.48 \pm 0.02\%$). Die 130 kDa-Bande entspricht der α -Kette und die 60 kDa-Bande reflektiert die β -Kette von NrCAM. (ThermoFisherScientific 2012)

Da die Expression auf Proteinebene nicht mit der auf mRNA-Ebene übereinstimmen muss, war eine Analyse mittels qRT-PCR ebenfalls von Interesse. Hierzu wurden Zellen der Passage 3, 5, 6, 8 und 9 untersucht. Auf mRNA-Ebene konnte eine große Varianz zwischen den einzelnen Passagen festgestellt werden (hSC P3: 0.01 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), hSC P5: 0.07 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle, hSC P6: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle, hSC P8: 0.05 ± 0.002 /fach der Ladekontrolle, hSC P9: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle), die allerdings kein Muster erkennen ließ (Abb. 16). So zeigten die Passagen 5 und 8 eine stärkere Expression als die restlichen der untersuchten Passagen. Die statistische Analyse der qRT-PCR beruht auf dem Mittelwert von drei technischen Replikaten. Hierbei bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von mRNA zwischen den einzelnen Passagen.

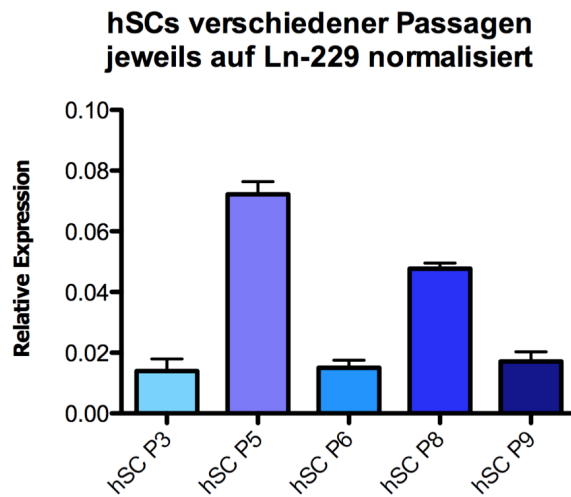


Abbildung 16: graphische Darstellung der Untersuchung verschiedener hSC Passagen auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR: relative Expression jeweils auf Ln-229 normalisiert (hSC P3: 0.01 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), hSC P5: 0.07 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle, hSC P6: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle, hSC P8: 0.05 ± 0.002 /fach der Ladekontrolle, hSC P9: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle)

1.2 Basisexpressionsprofil von L1CAM

Ebenso wie bei NrCAM wurden zur genaueren Lokalisation von L1CAM im normalen Pankreasgewebe und im Pankreaskarzinomgewebe immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Gegenfärbung angefertigt (Abb. 17). Im normalen Pankreasgewebe (Abb. 17, A und B) wie auch im Pankreaskarzinomgewebe (Abb. 17, C bis F) zeigten die Nerven eine deutliche Immunoreaktivität. Diese spezifische Färbung betraf sowohl die größeren Ganglien, als auch die feinsten Nervenendigungen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass L1CAM nicht nur auf den hSC exprimiert wird, sondern auch auf den Axonen der Nervenzellen. In einigen Fällen war in den Karzinomzellen um die Nerven ebenfalls eine schwache Immunoreaktivität zu erkennen (Abb. 17, F).

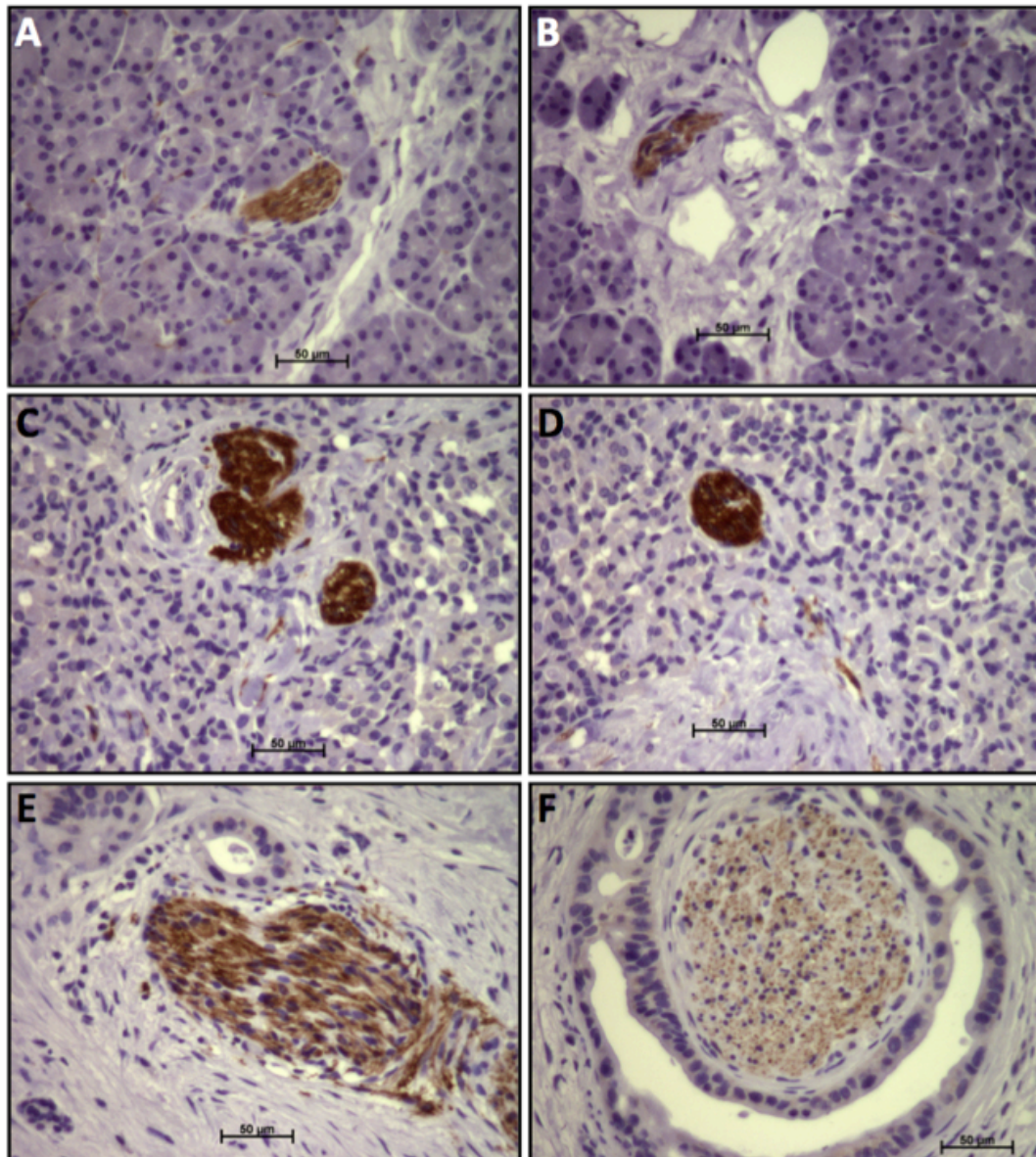


Abbildung 17: lichtmikroskopische Beispielfotografien der mit anti-L1CAM behandelten Gewebe mit Gegenfärbung: A+B=normales Pankreasgewebe: deutliche Färbung des Nerven zu erkennen; C+D=PCa-Gewebe: sehr starke Immunreaktivität der/des Nerven; E=PCa-Gewebe: deutliche Immunreaktivität des Nerven mit perineuraler Invasion; F=PCa-Gewebe: schwächere Immunreaktivität des Nerven mit sehr ausgeprägter perineuraler Invasion, schwache Immunreaktivität der PCC

Zur Quantifizierung des membranständigen Adhäsionsmoleküls L1CAM auf der Zelloberfläche der hSC wurden Western blots durchgeführt (Abb. 18). Die Untersuchung ergab, dass L1CAM auf allen in dieser Arbeit kultivierten hSC exprimiert wurde. Die Passage hatte dabei keinen Einfluss auf die Menge der Expression (hSC P3: $0.50 \pm 0.04\%$, hSC P4: $0.59 \pm 0.05\%$, hSC P5: $0.49 \pm 0.05\%$, hSC P6: $0.49 \pm 0.02\%$, hSC P7: $0.40 \pm 0.04\%$). Sowohl in der Positivkontrolle, als auch in den hSC-Proben konnte L1CAM bei 200 bis 240 kDa bzw. eines seiner zahlreichen Isoformen (180 kDa, 140 kDa, 85 kDa) detektiert werden (Abb. 18,

A). Die densitometrische Analyse der Banden (Abb. 18, B) zeigte keinen relevanten Unterschied zwischen den verschiedenen Passagen.

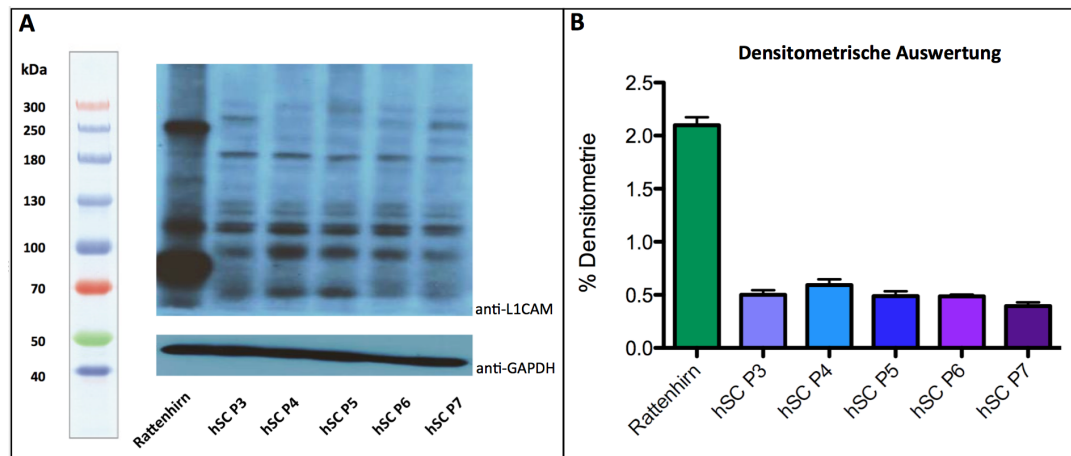


Abbildung 18: Untersuchung verschiedener Passagen hSC auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-L1CAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B= graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $2.01 \pm 0.08\%$, hSC P3: $0.50 \pm 0.04\%$, hSC P4: $0.59 \pm 0.05\%$, hSC P5: $0.49 \pm 0.05\%$, hSC P6: $0.49 \pm 0.02\%$, hSC P7: $0.40 \pm 0.04\%$). Die zahlreichen durch alternatives Spleißen und posttranslationäre proteolytische Spaltung entstandenen Isoformen von L1CAM konnten bei 240 kDa, 180 kDa, 140 kDa und 85 kDa nachgewiesen werden. (ThermoFisherScientific 2012)

Um die Expressionsanalyse von L1CAM auf den hSC zu komplettieren wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Untersuchung auf mRNA-Ebene bestätigte die Ergebnisse des Western blots. L1CAM wurde unabhängig von der Passage in allen Zellen exprimiert (Abb. 19). Mit Ausnahme von Passage 3 wurde auch in allen anderen Passagen etwa die gleiche Menge an mRNA detektiert (hSC P3: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), hSC P5: 0.26 ± 0.02 /fach der Ladekontrolle, hSC P6: 0.16 ± 0.006 /fach der Ladekontrolle, hSC P8: 0.24 ± 0.03 /fach der Ladekontrolle, hSC P9: 0.28 ± 0.02 /fach der Ladekontrolle). Die statistische Analyse der qRT-PCR beruht auf dem Mittelwert dreier technischer Replikate. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von mRNA zwischen den einzelnen Passagen.

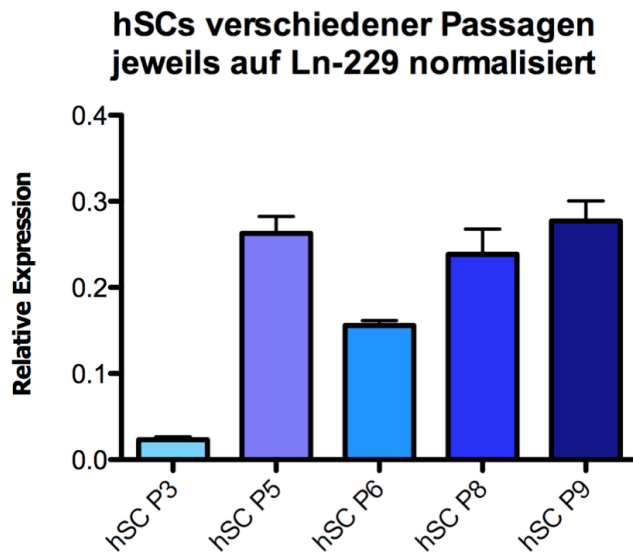


Abbildung 19: graphische Darstellung der Untersuchung verschiedener hSC Passagen auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels qRT-PCR: relative Expression jeweils auf Ln-229 normalisiert (hSC P3: 0.02 ± 0.003 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), hSC P5: 0.26 ± 0.02 /fach der Ladekontrolle, hSC P6: 0.16 ± 0.006 /fach der Ladekontrolle, hSC P8: 0.24 ± 0.03 /fach der Ladekontrolle, hSC P9: 0.28 ± 0.02 /fach der Ladekontrolle)

Bei einer Gegenüberstellung von NrCAM und L1CAM in der qRT-PCR (Abb. 20) fällt auf, dass auf den hSC erheblich mehr mRNA von L1CAM exprimiert wird. Lediglich die Expression in der Passage 3 ist ähnlich niedrig.

hSCs verschiedener Passagen: NrCAM und L1CAM im Vergleich jeweils auf Ln-229 normalisiert

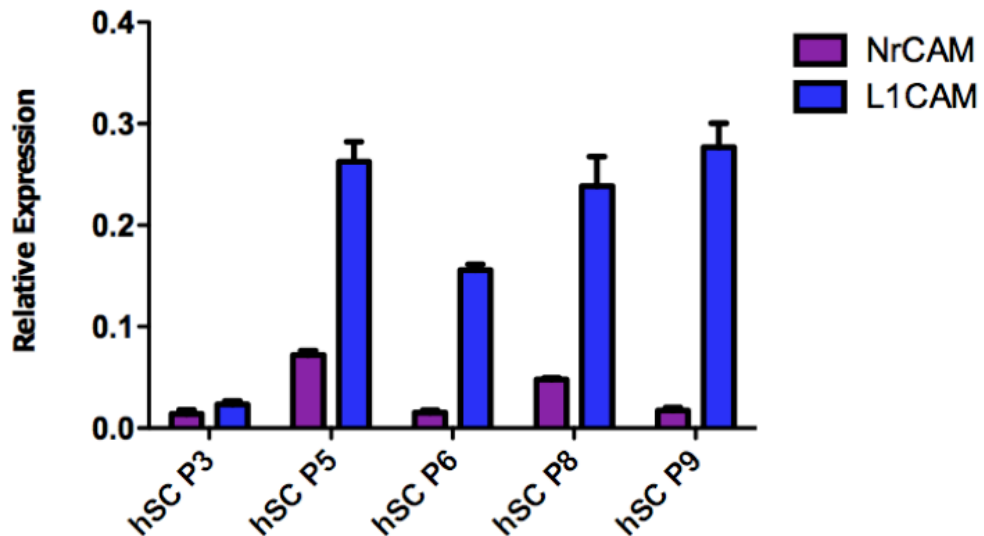


Abbildung 20: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse mit verschiedenen hSC Passagen: NrCAM und L1CAM im Vergleich (relative Expression jeweils auf Ln-229 normalisiert)

2 Expressionsanalyse der CAMs im Pankreasgewebe

Die Analyse von normalem Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomgewebe mittels Western blot und qRT-PCR sollte das Expressionsmuster von NrCAM und L1CAM im Gewebe aufzeigen. Die Proben für den Western blot setzten sich insgesamt aus Geweben von 9 gesunden Spendern und von 12 Patienten mit PDAC zusammen. Für die Analyse mittels qRT-PCR standen die Gewebe von jeweils 25 gesunden Spendern und Patienten mit PDAC zur Verfügung.

Die Analyse des gesamten Gewebes liefert keine Erkenntnisse bezüglich der Expression der CAMs im Nerven selbst bzw. auf den hSC in Abhängigkeit vom Gewebe. Aus diesem Grund wurden zusätzlich immunhistochemische Präparate dieser beiden Zelladhäsionsmoleküle angefertigt. Die Präparate setzten sich aus Geweben von 10 gesunden Spendern und von 20 Patienten mit PDAC zusammen. Mit Hilfe einer computergestützten Auswertung konnte die Immunoreaktivität in den einzelnen Nerven (insgesamt 825 Nerven je Oberflächenmolekül) der

verschiedenen Gewebe miteinander verglichen werden.

2.1 Expression von NrCAM im NP und im PCa

Die Expressionsanalyse von NrCAM im normalem Pankreasgewebe und im Pankreaskarzinomgewebe mittels qRT-PCR ergab eine tendenziell niedrigere Expression im Karzinomgewebe (NP: 6.87 ± 1.24 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), PCa: 4.03 ± 0.52 /fach der Ladekontrolle). Dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,114$).

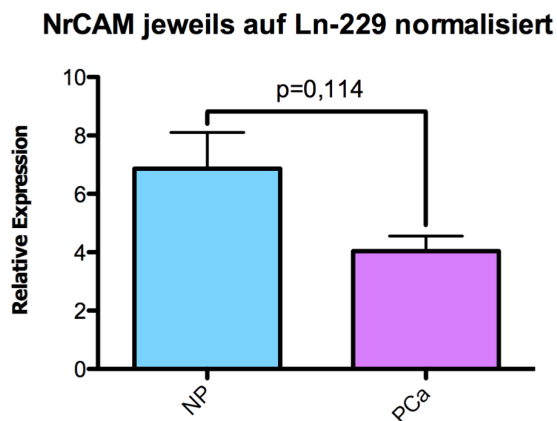


Abbildung 21: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse von NrCAM in normalem Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomgewebe: relative Expression von NrCAM jeweils auf Ln-229 normalisiert (NP: 6.87 ± 1.24 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), PCa: 4.03 ± 0.52 /fach der Ladekontrolle)

Die Expressionsanalyse von NrCAM im Gewebe mittels Western blot ergab keinen eindeutigen Unterschied zwischen den beiden Gewebearten (Abb. 22). Die densitometrische Analyse (Abb. 22, B) zeigte eine deutlich erhöhte Expression bei den Pankreaskarzinomproben 2 und 3 (NP1: $2.68 \pm 0.10\%$, NP2: $1.55 \pm 0.14\%$, NP3: $1.35 \pm 0.23\%$, PCa1: $2.20 \pm 0.34\%$, PCa2: 7.11 ± 0.29 , PCa3: $8.67 \pm 0.50\%$, PCa4: $2.22 \pm 0.19\%$). Die zwei anderen Proben zeigten jedoch keinerlei Unterschied zu den normalen Gewebeproben.

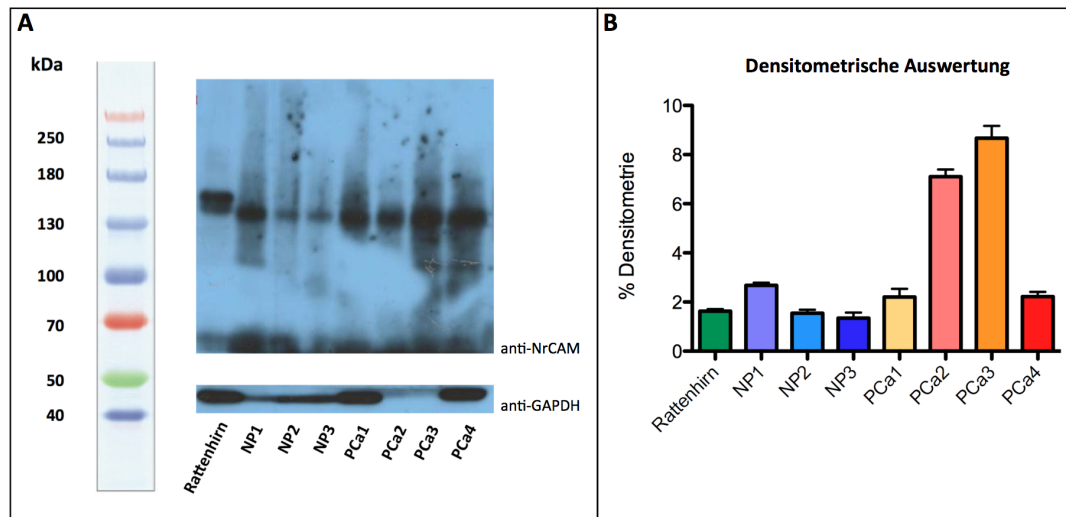


Abbildung 22: Untersuchung von Pankreasgewebe auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-NrCAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $1.63 \pm 0.08\%$, NP1: $2.68 \pm 0.10\%$, NP2: $1.55 \pm 0.14\%$, NP3: $1.35 \pm 0.23\%$, PCa1: $2.20 \pm 0.34\%$, PCa2: 7.11 ± 0.29 , PCa3: $8.67 \pm 0.50\%$, PCa4: $2.22 \pm 0.19\%$) (ThermoFisherScientific 2012)

Die immunhistochemische Analyse von NrCAM im Nerven ergab einen hochsignifikanten Unterschied (NP: $10.93 \pm 1.52\%$, PCa: 3.45 ± 1.37) zwischen den Nerven im normalen Pankreas und den Nerven im Pankreaskarzinom (Abb. 23). Die Immunoreaktivität der Nerven im Pankreasgewebe war hochsignifikant niedriger als im normalem Gewebe ($p < 0,001$).

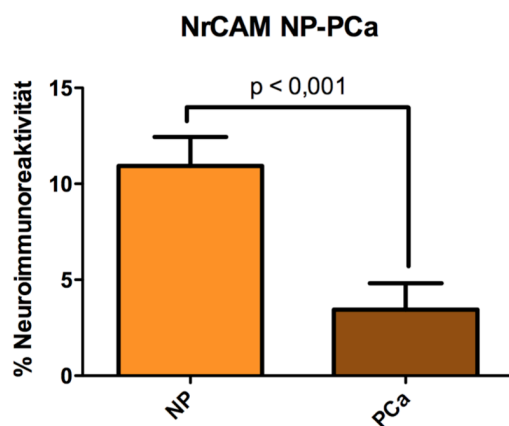


Abbildung 23: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM im Nerven in Abhängigkeit vom Gewebe: Die Nerven im Pankreaskarzinomgewebe zeigten hochsignifikant erniedrigte Immunoreaktivität im Vergleich zu den Nerven im normalen Pankreasgewebe. (NP: $10.93 \pm 1.52\%$, PCa: 3.45 ± 1.37)

2.2 Expression von L1CAM im NP und im PCa

Die Expressionsanalyse von L1CAM im normalem Pankreasgewebe und im Pankreaskarzinomgewebe mittels qRT-PCR ergab keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gewebearten (NP: 53.49 ± 9.17 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), PCa: 56.80 ± 10.41 /fach der Ladekontrolle).

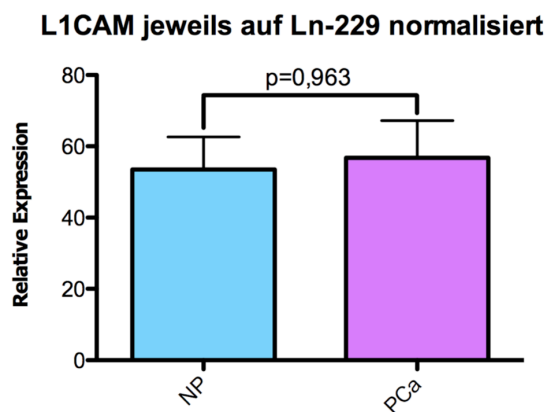


Abbildung 24: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse von L1CAM in normalem Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomgewebe: relative Expression von L1CAM jeweils auf Ln-229 normalisiert (NP: 53.49 ± 9.17 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), PCa: 56.80 ± 10.41 /fach der Ladekontrolle)

Die Expressionsanalyse von L1CAM im Gewebe auf Proteinebene ergab keinen eindeutigen Unterschied zwischen normalem Gewebe und Karzinomgewebe (Abb. 25). In Anbetracht der densitometrischen Analyse (Abb. 25, B) erscheint jedoch die Expression im Karzinomgewebe tendenziell ausgeprägter (NP1: $1.10 \pm 0.06\%$, NP2: $0.17 \pm 0.04\%$, NP3: $0.40 \pm 0.07\%$, PCa1: $0.80 \pm 0.05\%$, PCa2: $0.96 \pm 0.08\%$, PCa3: $1.98 \pm 0.13\%$, PCa4: $2.30 \pm 0.03\%$).

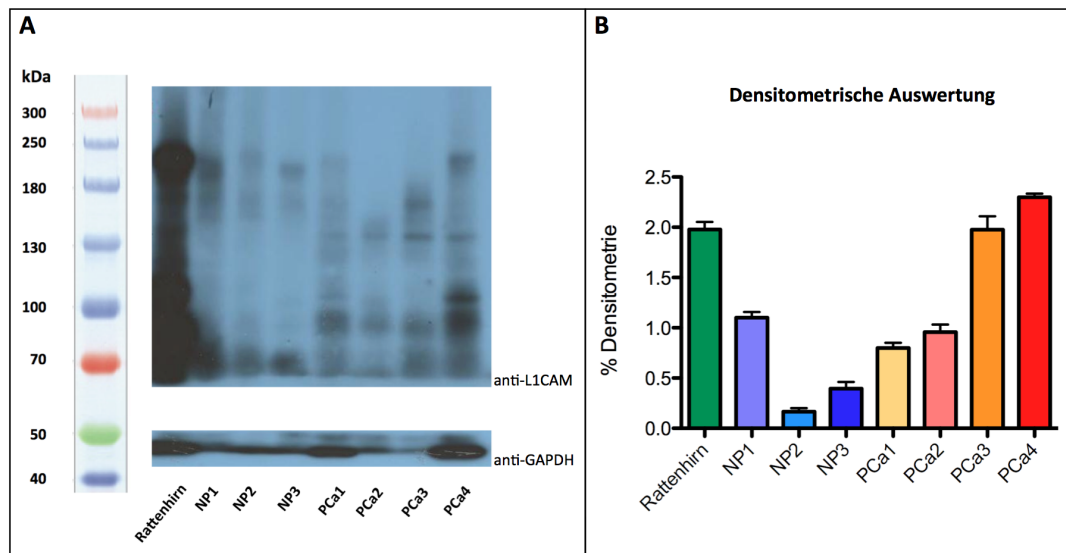


Abbildung 25: Untersuchung von Pankreasgewebe auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-L1CAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $1.98 \pm 0.08\%$, NP1: $1.10 \pm 0.06\%$, NP2: $0.17 \pm 0.04\%$, NP3: $0.40 \pm 0.07\%$, PCa1: $0.80 \pm 0.05\%$, PCa2: $0.96 \pm 0.08\%$, PCa3: $1.98 \pm 0.13\%$, PCa4: $2.30 \pm 0.03\%$) (ThermoFisherScientific 2012)

Die immunhistochemische Analyse von L1CAM im Nerven zeigte eine deutlich erhöhte Immunoreaktivität der Nerven im Pankreaskarzinomgewebe (NP: $5.87 \pm 1.92\%$, PCa: 10.40 ± 1.76) (Abb. 26). Dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,110$).

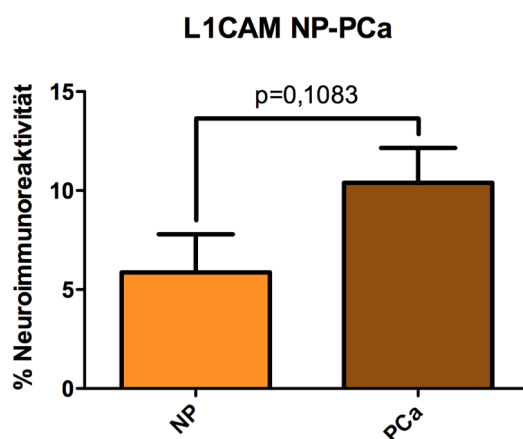


Abbildung 26: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM im Nerven in Abhängigkeit vom Gewebe: Die erhöhte Immunoreaktivität der Nerven im Pankreaskarzinomgewebe erreichte keine statistische Signifikanz. (NP: $5.87 \pm 1.92\%$, PCa: 10.40 ± 1.76)

3 Expression der CAMs auf PCC

Die Expression von NrCAM und L1CAM auf den im Rahmen dieses Projektes kultivierten PCC wurde mittels Western blot und qRT-PCR quantifiziert. Die Analysen wurden mit SU86.86 und MiaPaCa-2 durchgeführt. Diese beiden Zelllinien waren von besonderem Interesse, da sie für die funktionellen Analysen mittels Migrations- und Adhäsionsassay verwendet wurden.

3.1 Expression von NrCAM auf SU86.86 und MiaPaCa-2

Die Analyse mittels Western blot (Abb. 27) ergab, dass NrCAM sowohl auf der Zelloberfläche von SU86.86 als auch auf der von MiaPaCa-2 exprimiert wird. Die Expression auf MiaPaCa-2 ist jedoch im Vergleich geringer (SU86.86: $1.49 \pm 0.17\%$, MiaPaCa-2: $0.66 \pm 0.21\%$).

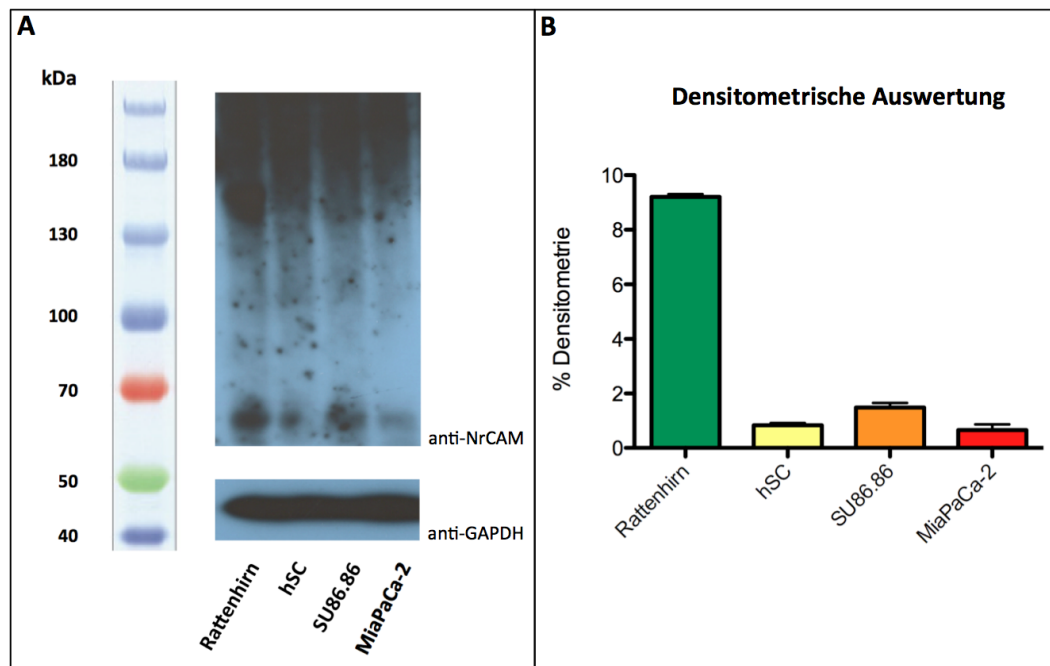


Abbildung 27: Untersuchung von PCC auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-NrCAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $9.20 \pm 0.10\%$, hSC: $0.84 \pm 0.09\%$, SU86.86: $1.49 \pm 0.17\%$, MiaPaCa-2: $0.66 \pm 0.21\%$) (ThermoFisherScientific 2012)

Die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (Abb. 28) stimmte nur zum Teil mit den Ergebnissen des Western blots überein. NrCAM konnte in der Pankreaskarzinomzelllinie SU86.86 mittels qRT-PCR deutlich detektiert werden (SU86.86: 0.20 ± 0.03 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B)). In dem Zelllysate aus MiaPaCa-2 wurde dagegen keine mRNA nachgewiesen. Die graphische Darstellung der qRT-PCR beruht auf der Auswertung von drei technischen Replikaten.

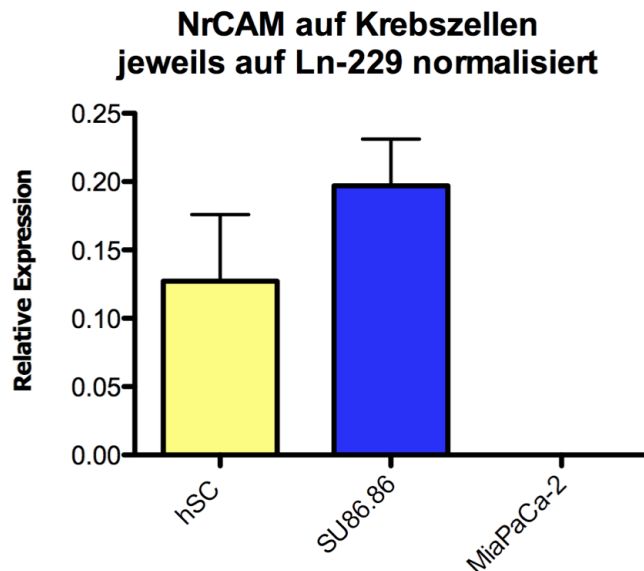


Abbildung 28: graphische Darstellung der Untersuchung von SU86.86 und MiaPaCa-2 auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR: relative Expression von NrCAM jeweils auf Ln-229 normalisiert, die hSC-Probe diente als Positivkontrolle und zum Vergleich (hSC: 0.13 ± 0.05 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), SU86.86: 0.20 ± 0.03 /fach der Ladekontrolle, MiaPaCa-2: 0 ± 0 /fach der Ladekontrolle)

3.2 Expression von L1CAM auf SU86.86 und MiaPaCa-2

Die Expressionsanalyse von L1CAM auf SU86.86 und MiaPaCa-2 kam auf Proteinebene (Abb. 29) und auf mRNA-Ebene (Abb. 30) zum selben Ergebnis. L1CAM konnte auf beiden Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Dabei war sowohl die Expression auf der Zelle als auch die mRNA in der Zelle bei SU86.86 stärker (SU86.86: $0.91 \pm 0.05\%$, MiaPaCa-2: $0.34 \pm 0.17\%$).

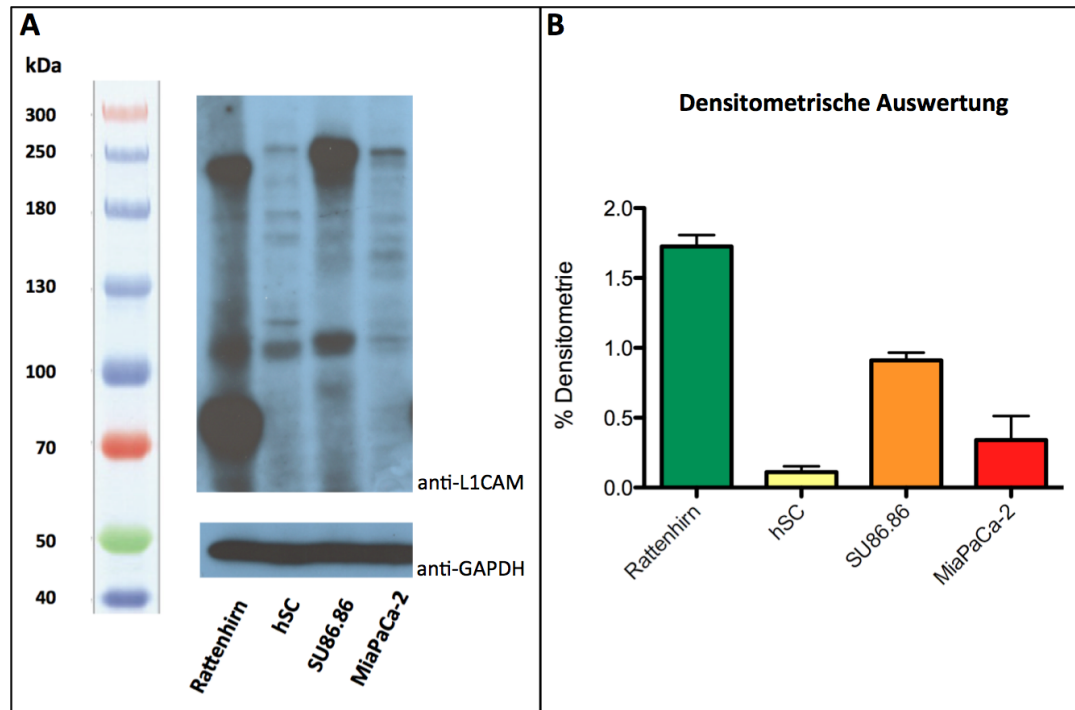


Abbildung 29: Untersuchung von PCC auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-L1CAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Analyse des Western blots (Auswertung dreier technischer Replikate: Rattenhirn: $1.73 \pm 0.08\%$, hSC: $0.11 \pm 0.04\%$, SU86.86: $0.91 \pm 0.05\%$, MiaPaCa-2: $0.34 \pm 0.17\%$) (ThermoFisherScientific 2012)

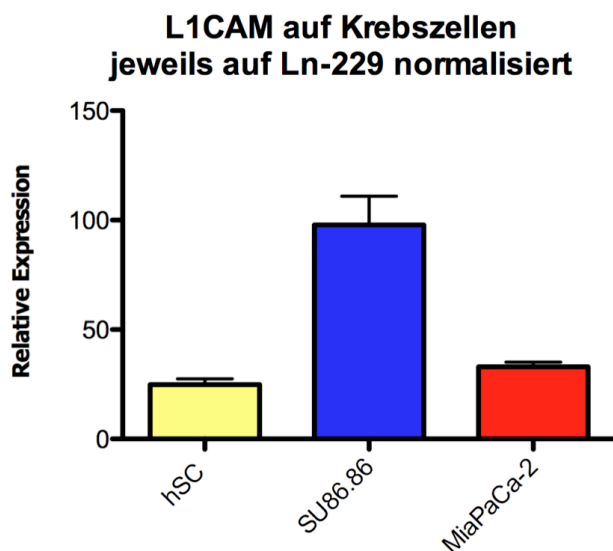


Abbildung 30: graphische Darstellung der Untersuchung von SU86.86 und MiaPaCa-2 auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels qRT-PCR: relative Expression von L1CAM jeweils auf Ln-229 normalisiert, die hSC-Probe diente als Positivkontrolle und zum Vergleich (hSC: 24.76 ± 2.72 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), SU86.86: 97.85 ± 13.12 /fach der Ladekontrolle, MiaPaCa-2: 32.93 ± 2.14 /fach der Ladekontrolle)

4 Expression von NrCAM auf Bindegewebszellen

In einer früheren Publikation der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die neurale Invasion der Karzinomzellen v.a. in bindegewebsreichen Regionen des Pankreas detektiert wird (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Basierend auf dieser Grundlage und aufgrund der Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen mit anti-NrCAM, in denen sich neben den pankreatischen Nerven auch das Bindegewebe als sehr reaktiv erwies, wurde die humane Fibroblastenzelllinie BJ ebenfalls auf die Expression von NrCAM hin untersucht. Mittels Western blot (BJ1: $0.12 \pm 0.04\%$, BJ2: $0.17 \pm 0.02\%$) (Abb. 31) und qRT-PCR (BJ: 0.01 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle) (Abb. 32) konnte eine, wenn auch sehr geringe Expression von NrCAM auf BJ nachgewiesen werden.

Pankreatische Sternzellen (PSC) gelten als Hauptbestandteil der desmoplastischen Reaktionen im PDAC und als potentielle Zellen, die die Tumorprogression des PDAC aktiv unterstützen (Erkan, Kleeff et al. 2007). Aufgrund dessen stand die Expression von NrCAM auf PSC im Fokus der weiteren Untersuchungen. Die Expression von NrCAM auf PSC konnte mittels Western blot (Abb. 31) in verschiedenen Proben nachgewiesen werden (PSC1: $0.84 \pm 0.03\%$, PSC2: $0.15 \pm 0.06\%$, PSC3: $0.37 \pm 0.03\%$, PSC4: $0.18 \pm 0.02\%$) und zeigte mit einer mittleren Immunoreaktivität von $0.39 \pm 0.04\%$ eine höhere mittlere Immunoreaktivität als die Expression von NrCAM auf BJ mit $0.15 \pm 0.03\%$.

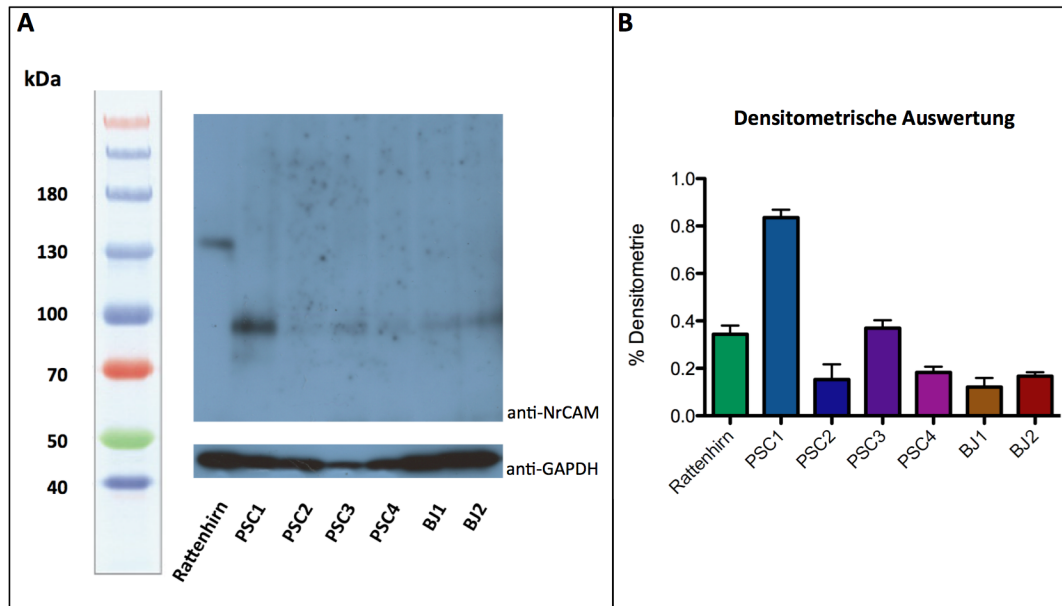


Abbildung 31: Untersuchung verschiedener Proben von PSC und BJ auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot: als Positivkontrolle wurde das Gehirngewebe der Ratte verwendet; A=obere Membran: mit anti-NrCAM behandelte Membran, untere Membran: Ladekontrolle mit anti-GAPDH; B=graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier technischer Replikate des Western blots (Rattenhirn: $0.34 \pm 0.04\%$, PSC1: $0.84 \pm 0.03\%$, PSC2: $0.15 \pm 0.06\%$, PSC3: $0.37 \pm 0.03\%$, PSC4: $0.18 \pm 0.02\%$, BJ1: $0.12 \pm 0.04\%$, BJ2: $0.17 \pm 0.02\%$) (ThermoFisherScientific 2012)

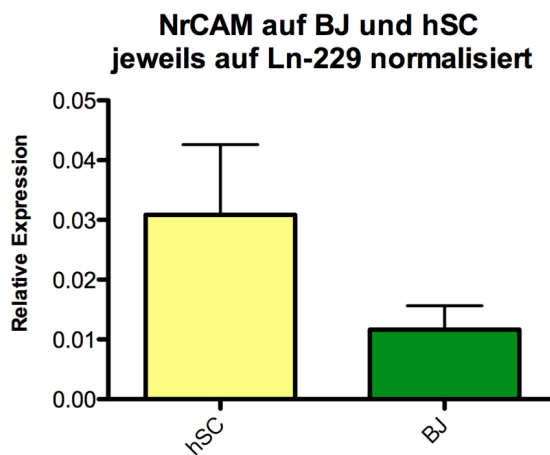


Abbildung 32: graphische Darstellung der Untersuchung von hSC im Vergleich zu BJ auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR: relative Expression von NrCAM jeweils auf Ln-229 normalisiert, die hSC-Probe diente als Positivkontrolle und zum Vergleich (hSC: 0.03 ± 0.01 /fach der Ladekontrolle (Cyclophilin B), BJ: 0.01 ± 0.004 /fach der Ladekontrolle)

5 Korrelation der neuralen Expression der CAMs mit der neuralen Invasion im humanen Pankreaskarzinom

Die Karzinomzellinvasion von intra- und extrapankreatischen Nerven ist ein bedeutender Metastasierungsweg im PDAC. Sie steht in engem Zusammenhang mit den hohen Lokalrezidivraten nach Pankreatektomie und damit auch mit der schlechten Prognose des PDAC. (Liu und Lu 2002)

Vor diesem Hintergrund war es von sehr großem Interesse, ob eine Korrelation zwischen der neuralen Invasion und der Expression der beiden CAMs besteht. Um die spezifische neurale und perineurale Expression von NrCAM und L1CAM im Pankreaskarzinom quantitativ bestimmen zu können, wurden immunhistochemische Präparate dieser beiden Zelladhäsionsmoleküle angefertigt. Die Präparate stammten von 20 Patienten mit PDAC. Mit Hilfe einer computergestützten Auswertung konnte die Färbeintensität jedes einzelnen Nerven (insgesamt 591 Nerven) der verschiedenen Gewebeschnitte bestimmt werden. Hierbei wurde der Grad der neuralen Invasion (keine=Grad 0, perineurale=Grad 1 oder endoneurale Invasion=Grad 2) berücksichtigt und jeweils die Intensität der Färbung miteinander verglichen.

5.1 NrCAM

In der immunhistochemischen Analyse der neuralen Expression von NrCAM konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Nerven ohne neurale Invasion und den Nerven mit neuraler Invasion beobachtet werden (Abb. 33). Die Nerven mit neuraler Invasion zeigten im Vergleich eine hochsignifikant erniedrigte Immunoreaktivität (Grad 0: $2.97 \pm 0.30\%$, Grad 1: $0.86 \pm 0.20\%$, Grad 2: $1.09 \pm 0.21\%$). Zwischen den Nerven mit neuraler Invasion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

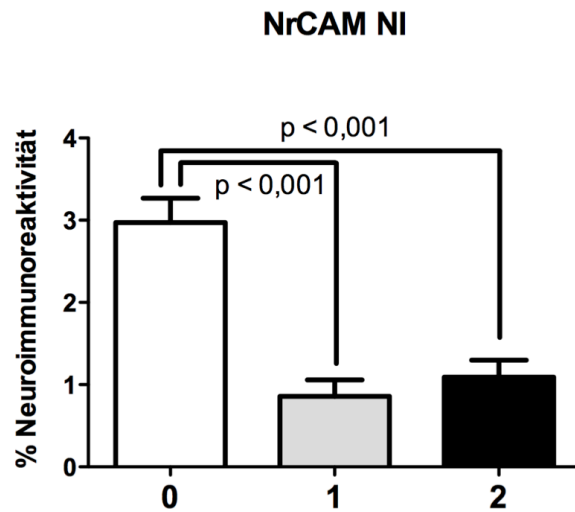


Abbildung 33: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM bezüglich der neuralen Expression im Pankreaskarzinom: Die Nerven mit Invasion zeigten hochsignifikant erniedrigte Immunoreaktivität im Vergleich zu den Nerven ohne Invasion (Grad 0=keine Invasion, Grad 1=perineurale Invasion, Grad 2=endoneurale Invasion des Nerven). (Grad 0: 2.97±0.30%, Grad 1: 0.86±0.20%, Grad 2: 1.09±0.21%)

5.2 L1CAM

Die immunhistochemische Analyse der neuralen Expression von L1CAM zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nerven mit und ohne neuraler Invasion (Grad 0: 11.87±0.60%, Grad 1: 12.89±1.55%, Grad 2: 10.32±0.826%) (Abb. 34).

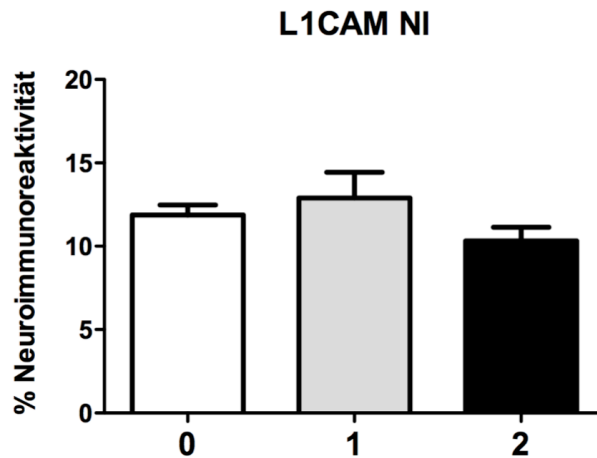


Abbildung 34: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM bezüglich der neuralen Expression im Pankreaskarzinom: Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Grad 0=keine Invasion, Grad 1=perineurale Invasion, Grad 2=endoneurale Invasion des Nerven). (Grad 0: 11.87±0.60%, Grad 1: 12.89±1.55%, Grad 2: 10.32±0.826%)

6 Korrelation der neuralen Expression der CAMs mit Schmerz

Die perineurale und endoneurale Invasion der Nerven ist eine typische pathologische Veränderung des PDAC und steht im Zusammenhang mit den für dieses Karzinom charakteristischen z.T. sehr starken Schmerzen (Ceyhan, Demir et al. 2009). Deshalb war es von großem Interesse, ob eine Korrelation der neuralen Expression von NrCAM und L1CAM mit Schmerz besteht. Hierfür wurden vor der Operation die Intensität und die Frequenz der Schmerzen dokumentiert. Basierend auf diesen Daten wurde ein Schmerz-Score kalkuliert. Die Multiplikation des Scores für die Intensität mit dem für die Frequenz der Schmerzen ergab den endgültigen Schmerz-Score, der den Schweregrad der Schmerzen repräsentierte (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Das Ausmaß der Schmerzen wurde wie folgt eingestuft: Grad 0=keine, Grad I=milde und Grad II=mäßige bis starke Schmerzen.

6.1 NrCAM

Die immunhistochemische Analyse ergab keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression von NrCAM und der Schmerzintensität der Patienten (Abb. 35). Die Immunoreaktivität von NrCAM im Nerv war allerdings bei den Patienten mit Schmerzen tendenziell niedriger als bei den Patienten ohne Schmerzen (Grad 0: $5.34 \pm 2.49\%$, Grad I: $0.80 \pm 0.37\%$, Grad II: $1.50 \pm 0.38\%$).

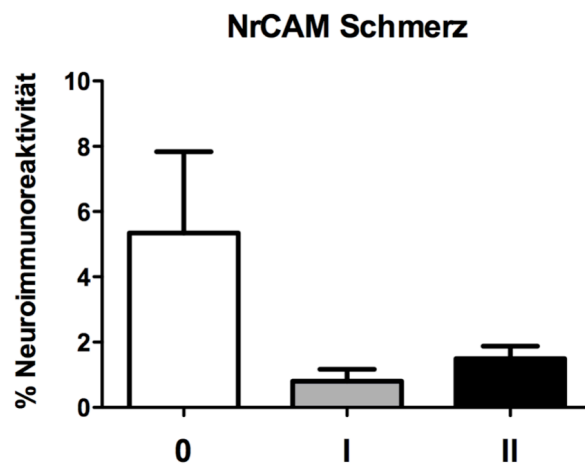


Abbildung 35: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM in Korrelation mit Schmerz: Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Schmerz-Gruppen (Grad 0=keine Schmerzen, Grad I=milde Schmerzen, Grad II=mäßige bis starke Schmerzen). (Grad 0: $5.34 \pm 2.49\%$, Grad I: $0.80 \pm 0.37\%$, Grad II: $1.50 \pm 0.38\%$)

6.2 L1CAM

Wie die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung zeigt (Abb. 36), konnte keine Korrelation zwischen der Expression von L1CAM und dem Schmerzempfinden der Patienten festgestellt werden (Grad 0: $9.28 \pm 2.78\%$, Grad I: $13.52 \pm 6.27\%$, Grad II: $10.66 \pm 2.18\%$).

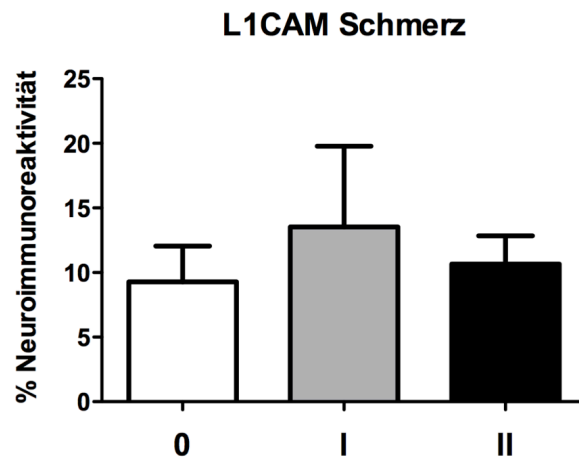


Abbildung 36: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM in Korrelation mit Schmerz: Es zeigten sich eine sehr große Varianz und keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Schmerz-Gruppen (Grad 0=keine Schmerzen, Grad I=milde Schmerzen, Grad II=mäßige bis starke Schmerzen). (Grad 0: $9.28 \pm 2.78\%$, Grad I: $13.52 \pm 6.27\%$, Grad II: $10.66 \pm 2.18\%$)

7 Identifizierung der Spezifität der Migration der hSC

Bisher nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe Ceyhan haben gezeigt, dass für die neuronale Invasion im PDAC nicht nur die Migration von PCC zu neuronalen Strukturen typisch ist, sondern auch die zielgerichtete Migration der hSC zu den PCC. Die Migration der hSC sollte mit der Hilfe von Migrationsassays auf ihre Spezifität hin überprüft werden.

Im ersten Ansatz wurden hSC mit PCC (in diesem Fall T3M4) einerseits und mit PSCs andererseits im 3D in-vitro Migrationsassay co-kultiviert (Abb. 37, A). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung ergaben eine signifikant höhere zelluläre Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 37, B), Zellmassenwanderung (Abb. 37, C), Direktionalität (Abb. 37, D) und einen signifikant höheren FMI (Abb. 37, E) der hSC zu den PCC als zu den PSCs (Geschwindigkeit: hSC-T3M4: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-PSC: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0.05 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$; Distanz: hSC-T3M4: $56.74 \pm 1.98 \mu\text{m}$, hSC-PSC: $35.35 \pm 1.63 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $31.10 \pm 1.70 \mu\text{m}$; Direktionalität: hSC-T3M4: 0.71 ± 0.01 , hSC-PSC: 0.55 ± 0.02 , hSC-LEER: 0.54 ± 0.02 ; FMI: hSC-T3M4: 0.60 ± 0.02 , hSC-PSC: 0.30 ± 0.03 , hSC-LEER: 0.33 ± 0.03). Diese Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von 6 technischen Replikaten.

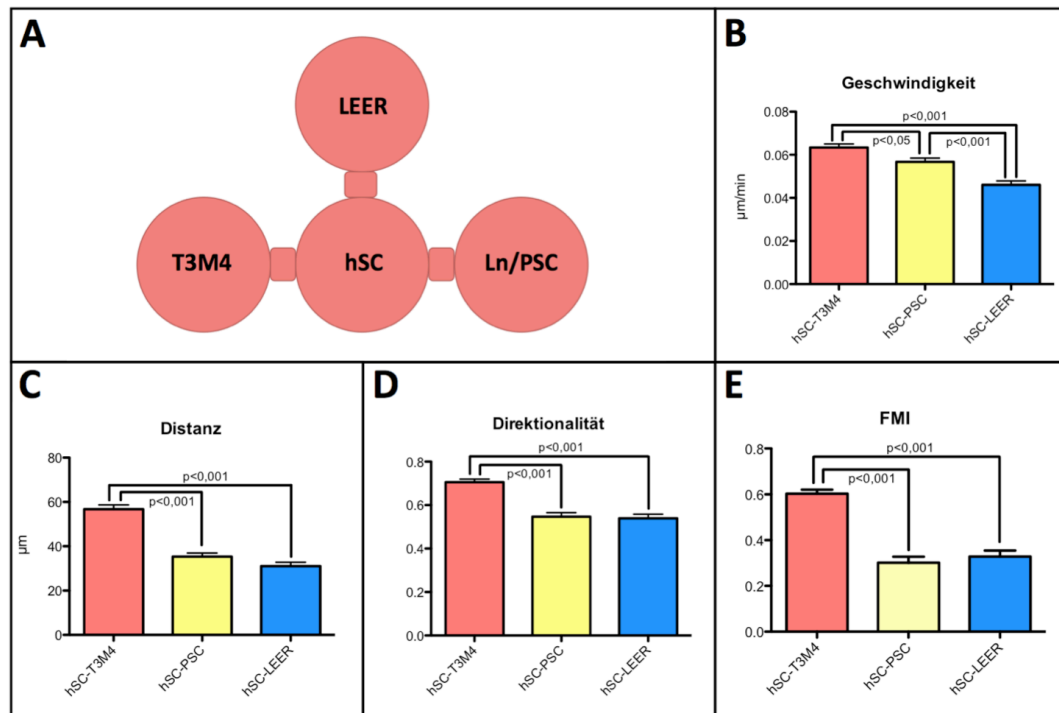


Abbildung 37: 3D in-vitro Migrationsassay zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration zu T3M4 im Vergleich zu PSC: A=schematische Darstellung des Ansatzes; B=quantitative Darstellung der Geschwindigkeit der Zellmigration; C=quantitative Darstellung der von den Zellen zurückgelegten euklidischen Distanz; D=quantitative Darstellung der Direktionalität der Zellmigration; E=quantitative Darstellung des FMI der Zellen (Geschwindigkeit: hSC-T3M4: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-PSC: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0.05 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$; Distanz: hSC-T3M4: $56.74 \pm 1.98 \mu\text{m}$, hSC-PSC: $35.35 \pm 1.63 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $31.10 \pm 1.70 \mu\text{m}$; Direktionalität: hSC-T3M4: 0.71 ± 0.01 , hSC-PSC: 0.55 ± 0.02 , hSC-LEER: 0.54 ± 0.02 ; FMI: hSC-T3M4: 0.60 ± 0.02 , hSC-PSC: 0.30 ± 0.03 , hSC-LEER: 0.33 ± 0.03)

Im zweiten Ansatz wurden die hSC im Migrationsassay simultan mit PCC (T3M4) und Glioblastomzellen (Ln-229) konfrontiert. Auch bei diesem Ansatz zeigte die statistische Auswertung eine höhere zelluläre Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 38, A), Zellmassenwanderung (Abb. 38, B) und einen signifikant höheren FMI (Abb. 38, D) der hSC zu den PCC als zu den Glioblastomzellen. Einzig die Direktionalität zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Front mit T3M4 und der mit Ln-229 (Abb. 38, C) (Geschwindigkeit: hSC-T3M4: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LN: $0.04 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0.04 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$; Distanz: hSC-T3M4: $52.14 \pm 1.70 \mu\text{m}$, hSC-LN: $36.02 \pm 1.58 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $34.94 \pm 1.66 \mu\text{m}$; Direktionalität: hSC-T3M4: 0.85 ± 0.01 , hSC-LN: 0.84 ± 0.01 , hSC-LEER: 0.76 ± 0.02 ; FMI: hSC-T3M4: 0.71 ± 0.02 , hSC-LN: 0.57 ± 0.03 , hSC-LEER: 0.50 ± 0.03). Die Ergebnisse der statistischen Analyse beruhen auf der Auswertung von 6 technischen Replikaten.

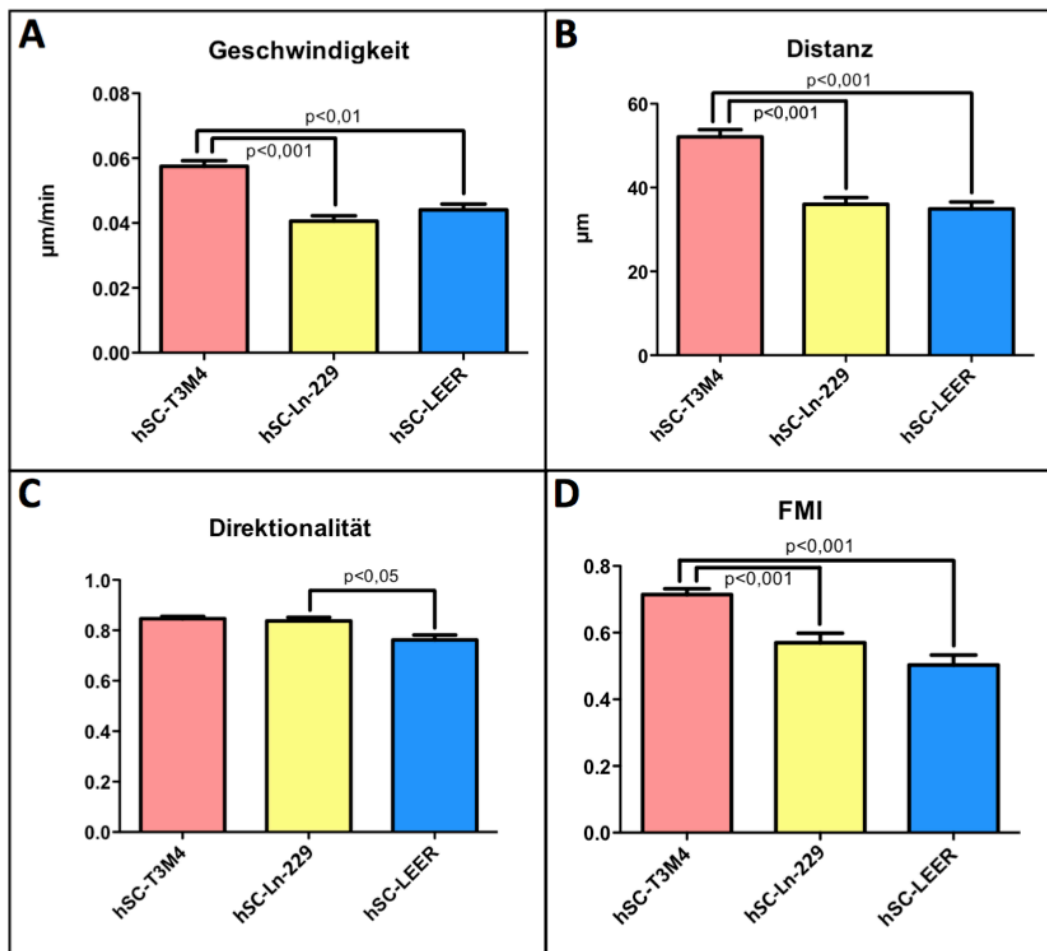


Abbildung 38: 3D in-vitro Migrationsassay zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration zu T3M4 im Vergleich zu Ln-229 (LN): A=quantitative Darstellung der Geschwindigkeit der Zellmigration; B=quantitative Darstellung der von den Zellen zurückgelegten euklidischen Distanz; C=quantitative Darstellung der Direktionalität der Zellmigration; D=quantitative Darstellung des FMI der Zellen (Geschwindigkeit: hSC-T3M4: $0.06 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LN: $0.04 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0.04 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{min}$; Distanz: hSC-T3M4: $52.14 \pm 1.70 \mu\text{m}$, hSC-LN: $36.02 \pm 1.58 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $34.94 \pm 1.66 \mu\text{m}$; Direktionalität: hSC-T3M4: 0.85 ± 0.01 , hSC-LN: 0.84 ± 0.01 , hSC-LEER: 0.76 ± 0.02 ; FMI: hSC-T3M4: 0.71 ± 0.02 , hSC-LN: 0.57 ± 0.03 , hSC-LEER: 0.50 ± 0.03)

8 Einfluss der CAMs auf die Interaktion zwischen hSC und PCC

Zuletzt wurde der Einfluss von NrCAM und L1CAM auf die Interaktion zwischen hSC und PCC untersucht. Hierfür wurden die beiden CAMs auf den hSC und auch auf den PCC selektiv ausgeschaltet. Dies erfolgte mit der Hilfe von

blockierenden Antikörpern. Anschließend wurden die Eigenschaften der mit Antikörpern blockierten Zellen mit den Kontrollzellen im Adhäsionsassay und im Migrationsassay verglichen.

8.1 Einfluss von NrCAM auf die Zell-Zell-Adhäsion

Die Beeinflussung der Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC durch NrCAM wurde mit Hilfe des Adhäsionsassays überprüft. Die Untersuchung erfolgte anhand von zwei verschiedenen Karzinomzelllinien (SU86.86 und MiaPaCa-2). Für die statistische Analyse (Abb. 39) wurden pro Zelllinie jeweils drei technische Replikate ausgewertet. Weder durch die Blockade von NrCAM auf den hSC (Abb. 39, A und D) noch durch die Blockade auf den PCC (Abb. 39, C und F) konnte ein Effekt auf die Adhäsion festgestellt werden. Auch eine kombinierte Antikörperblockade von hSC und PCC (Abb. 39, B und E) hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Adhäsion.

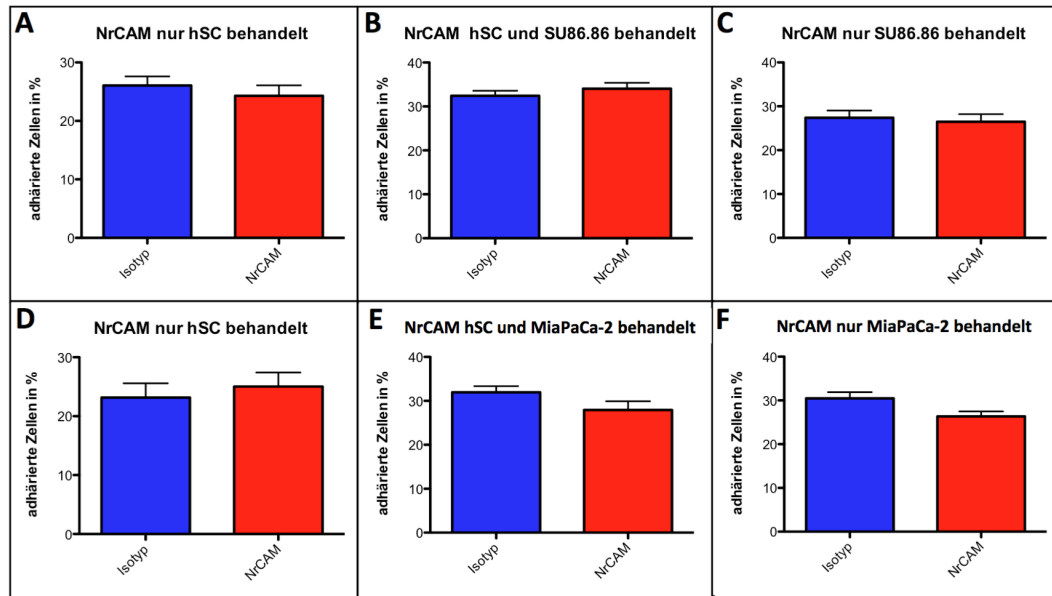


Abbildung 39: Adhäsionsassay mit anti-NrCAM geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und SU86.86; D bis F=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und MiaPaCa-2; A=nur hSC behandelt, B=hSC und SU86.86 behandelt, C=nur SU86.86 behandelt; D=nur hSC behandelt, E=hSC und MiaPaCa-2 behandelt, F=nur MiaPaCa-2 behandelt (A=Isotyp: 26.07±1.55%, NrCAM: 24.28±1.81%; B=Isotyp: 32.42±1.17%, NrCAM: 34.06±1.33%; C=Isotyp: 27.39±1.66%, NrCAM: 26.50±1.72%; D=Isotyp: 23.18±2.42%, NrCAM: 25.05±2.36%; E=Isotyp: 31.96±1.39%, NrCAM: 27.91±2.02%; F=Isotyp: 30.47±1.40%, NrCAM: 26.36±1.12%)

8.2 Einfluss von L1CAM auf die Zell-Zell-Adhäsion

Die Bedeutung von L1CAM im Zusammenhang mit der Zell-Zell-Adhäsion von hSC und PCC wurde ebenfalls mit Hilfe mehrerer Adhäsionsassays überprüft. Die Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Karzinomzelllinien (SU86.86 und MiaPaCa-2) durchgeführt. Für die statistische Analyse wurden pro Zelllinie und Antikörper jeweils drei technische Replikate ausgewertet (Abb. 40, 41, 42, 43 und 44). Um möglichst viele Epitope des Zelladhäsionsmoleküls L1CAM in die Untersuchungen einschließen zu können, wurden 5 verschiedene Antikörper (L1CAM Nr. 1, 2, 3, 4, und 7) verwendet. Jeder Antikörper bindet dabei spezifisch an ein anderes Epitop des Oberflächenmoleküls.

Durch die alleinige Blockade der hSC mit anti-L1CAM konnte keine statistisch signifikante Beeinflussung der Zelladhäsion erreicht werden (Abb. 40 und 41, A und D; Abb. 42, 43 und 44, A). Die Blockade der PCC dagegen führte zu einer

signifikant niedrigeren Adhäsion an den hSC im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 40 und 41, C und F; Abb. 42, 43 und 44, C). Eine zusätzliche Behandlung der hSC mit anti-L1CAM zeigte keine weitere Reduktion der Adhäsion (Abb. 40 und 41, B und E; Abb. 42, 43 und 44, B). Es zeigte sich bezüglich der verminderten Zelladhäsion kein deutlicher Unterschied zwischen dem Ansatz mit alleiniger Antikörperblockade der PCC und dem Ansatz mit der Blockade von PCC und hSC. Zudem zeigte sich kein bedeutender Unterschied im Zelladhäsionsprofil zwischen den beiden Karzinomzelllinien, weshalb sich die weiteren Untersuchungen der verschiedenen L1CAM-Epitope auf eine Karzinomzelllinie konzentrierten.

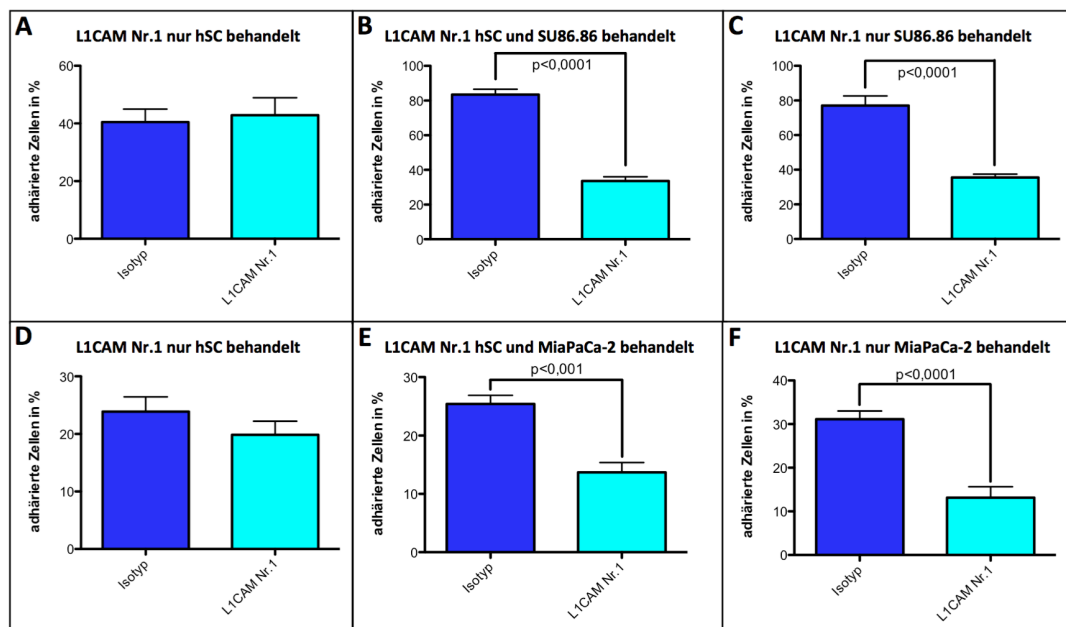


Abbildung 40: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.1 geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und SU86.86; D bis F=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und MiaPaCa-2; A=nur hSC behandelt, B=hSC und SU86.86 behandelt, C=nur SU86.86 behandelt; D=nur hSC behandelt, E=hSC und MiaPaCa-2 behandelt, F=nur MiaPaCa-2 behandelt (A=Isotyp: 40.50±4.49%, L1CAM Nr.1: 42.88±6.04%; B=Isotyp: 83.50±3.02%, L1CAM Nr.1: 33.61±2.40%; C=Isotyp: 77.06±5.59%, L1CAM Nr.1: 35.53±1.94%; D=Isotyp: 23.88±2.56%, L1CAM Nr.1: 19.86±2.36%; E=Isotyp: 25.40±1.47%, L1CAM Nr.1: 13.69±1.68%; F=Isotyp: 31.10±1.91%, L1CAM Nr.1: 13.15±2.51%)

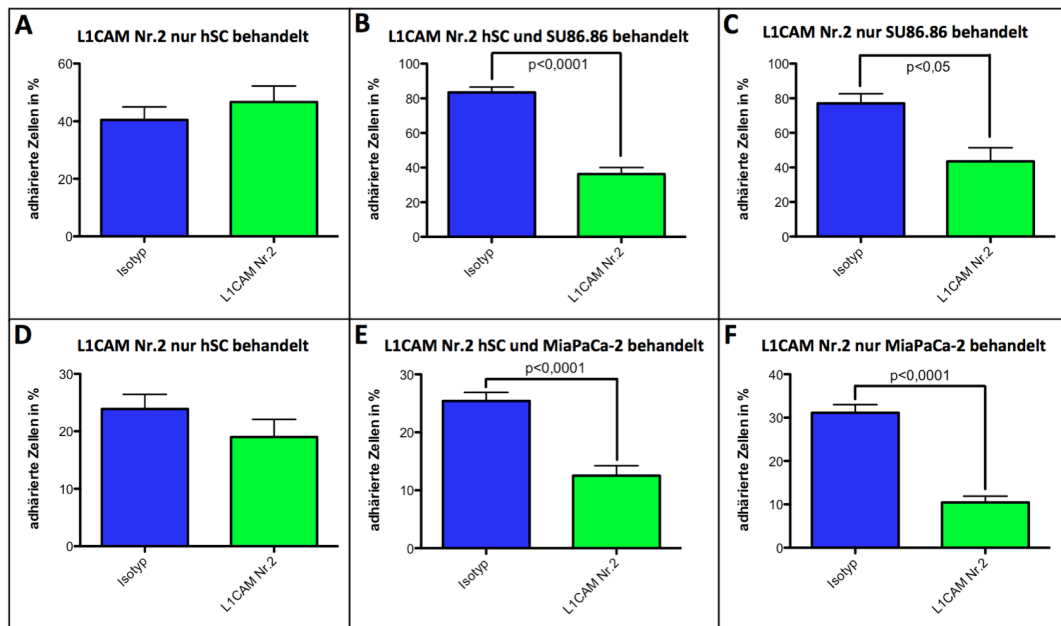


Abbildung 41: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.2 geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und SU86.86; D bis F=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und MiaPaCa-2; A=nur hSC behandelt, B=hSC und SU86.86 behandelt, C=nur SU86.86 behandelt; D=nur hSC behandelt, E=hSC und MiaPaCa-2 behandelt, F=nur MiaPaCa-2 behandelt (A=Isotyp: 40.50±4.49%, L1CAM Nr.2: 46.68±5.55%; B=Isotyp: 83.50±3.02%, L1CAM Nr.2: 36.31±3.69%; C=Isotyp: 77.06±5.59%, L1CAM Nr.2: 43.57±7.84%; D=Isotyp: 23.88±2.56%, L1CAM Nr.2: 19.02±3.07%; E=Isotyp: 25.40±1.47%, L1CAM Nr.2: 12.52±1.72%; F=Isotyp: 31.10±1.91%, L1CAM Nr.2: 10.46±1.43%)

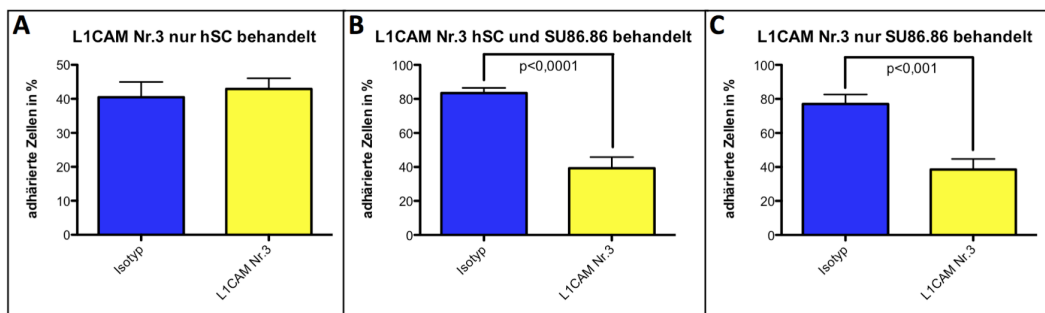


Abbildung 42: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.3 geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und SU86.86; A=nur hSC behandelt, B=hSC und SU86.86 behandelt, C=nur SU86.86 behandelt (A=Isotyp: 40.50±4.49%, L1CAM Nr.3: 42.93±3.14%; B=Isotyp: 83.50±3.02%, L1CAM Nr.3: 39.27±6.55%; C=Isotyp: 77.06±5.59%, L1CAM Nr.3: 38.50±6.23%)

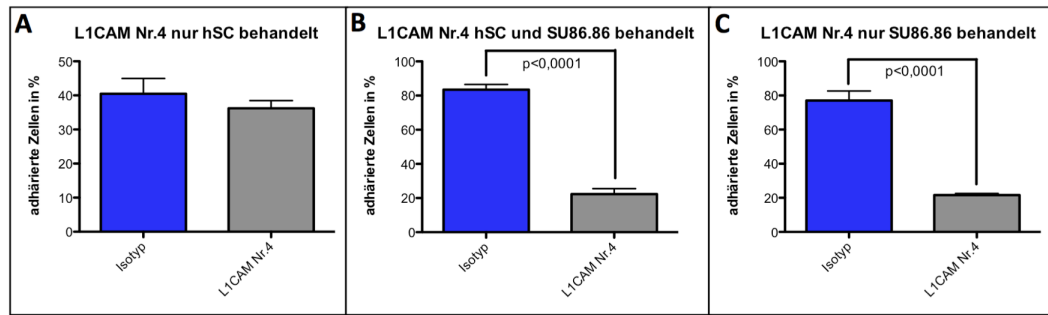


Abbildung 43: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.4 geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und SU86.86; A=nur hSC behandelt, B=hSC und SU86.86 behandelt, C=nur SU86.86 behandelt (A=Isotyp: 40.50±4.49%, L1CAM Nr.4: 36.23±2.24%; B=Isotyp: 83.50±3.02%, L1CAM Nr.4: 22.32±3.21%; C=Isotyp: 77.06±5.59%, L1CAM Nr.4: 21.60±0.96%)

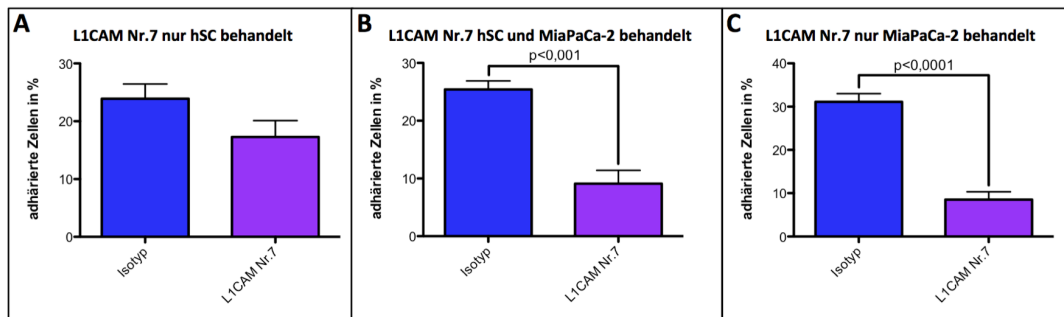


Abbildung 44: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.7 geblockten Zellen: A bis C=quantitative Darstellung der Adhäsionsassays mit hSC und MiaPaCa-2; A=nur hSC behandelt, B=hSC und MiaPaCa-2 behandelt, C=nur MiaPaCa-2 behandelt (A=Isotyp: 23.88±2.56%, L1CAM Nr.7: 17.29±2.83%; B=Isotyp: 25.40±1.47%, L1CAM Nr.7: 9.12±2.30%; C=Isotyp: 31.10±1.91%, L1CAM Nr.7: 8.52±1.80%)

8.3 Einfluss von L1CAM auf das Migrationsverhalten der hSC

Aufgrund der Ergebnisse der Adhäsionsassays war v.a. L1CAM für die weiteren funktionellen Analysen von Interesse. Um den Einfluss von L1CAM auf das Migrationsverhalten der hSC zu ergründen, wurden Migrationsassays mit anti-L1CAM blockierten hSC durchgeführt (Abb. 45, A). Unbehandelte SU86.86 wurden gleichzeitig mit anti-L1CAM behandelten hSC co-kultiviert und zur Kontrolle sowohl mit unbehandelten als auch mit Isotyp-Antikörpern behandelten hSC co-kultiviert. Die statistischen Analysen (Abb. 45, B bis I) zeigten bezüglich der zellulären Durchschnittsgeschwindigkeit, der Zellmassenwanderung, der Direktionalität und des FMI das gleiche Ergebnis. Für die statistischen Analysen

wurden jeweils drei technische Replikate ausgewertet. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Front der unbehandelten SU86.86 gegen die der anti-L1CAM behandelten hSC und der Front der unbehandelten SU86.86 gegen die der Isotyp-Antikörper behandelten hSC. Beim Vergleich der Front der unbehandelten SU86.86 gegen die der anti-L1CAM behandelten hSC mit der Front der unbehandelten SU86.86 gegen die der unbehandelten hSC waren alle statistischen Parameter bei der erstgenannten Front signifikant niedriger.

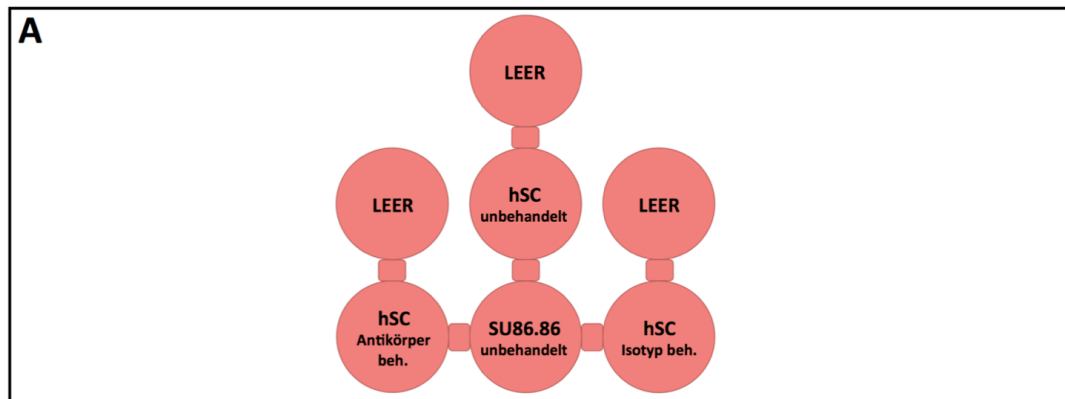


Abbildung 45: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten hSC:

A=schematische Darstellung des Ansatzes

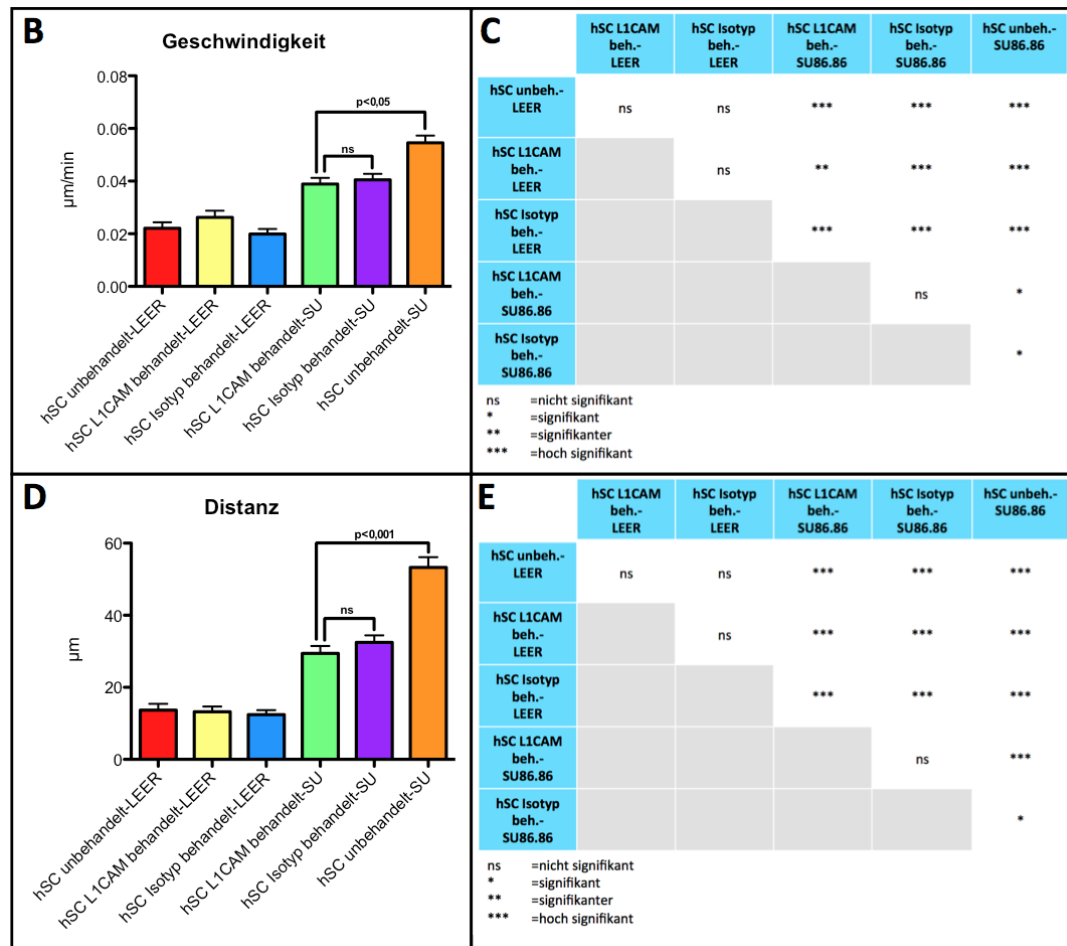


Abbildung 45: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten hSC:

B=quantitative Darstellung der Geschwindigkeit der Zellmigration; C=tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen (multiples Vergleichsverfahren nach Dunn) von Graphik B; D=quantitative Darstellung der von den Zellen zurückgelegten euklidischen Distanz; E=tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen (multiples Vergleichsverfahren nach Dunn) von Graphik D (B=hSC unbeh.-LEER: 0.02 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{min}$, hSC L1CAM beh.-LEER: 0.03 ± 0.003 $\mu\text{m}/\text{min}$, hSC Isotyp beh.-LEER: 0.02 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{min}$, hSC L1CAM beh.-SU86.86: 0.04 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{min}$, hSC Isotyp beh.-SU86.86: 0.04 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{min}$, hSC unbeh.-SU86.86: 0.06 ± 0.003 $\mu\text{m}/\text{min}$; D=hSC unbeh.-LEER: 13.66 ± 1.76 μm , hSC L1CAM beh.-LEER: 13.21 ± 1.45 μm , hSC Isotyp beh.-LEER: 12.43 ± 1.219 μm , hSC L1CAM beh.-SU86.86: 29.42 ± 2.03 μm , hSC Isotyp beh.-SU86.86: 32.49 ± 1.95 μm , hSC unbeh.-SU86.86: 53.27 ± 2.88 μm)

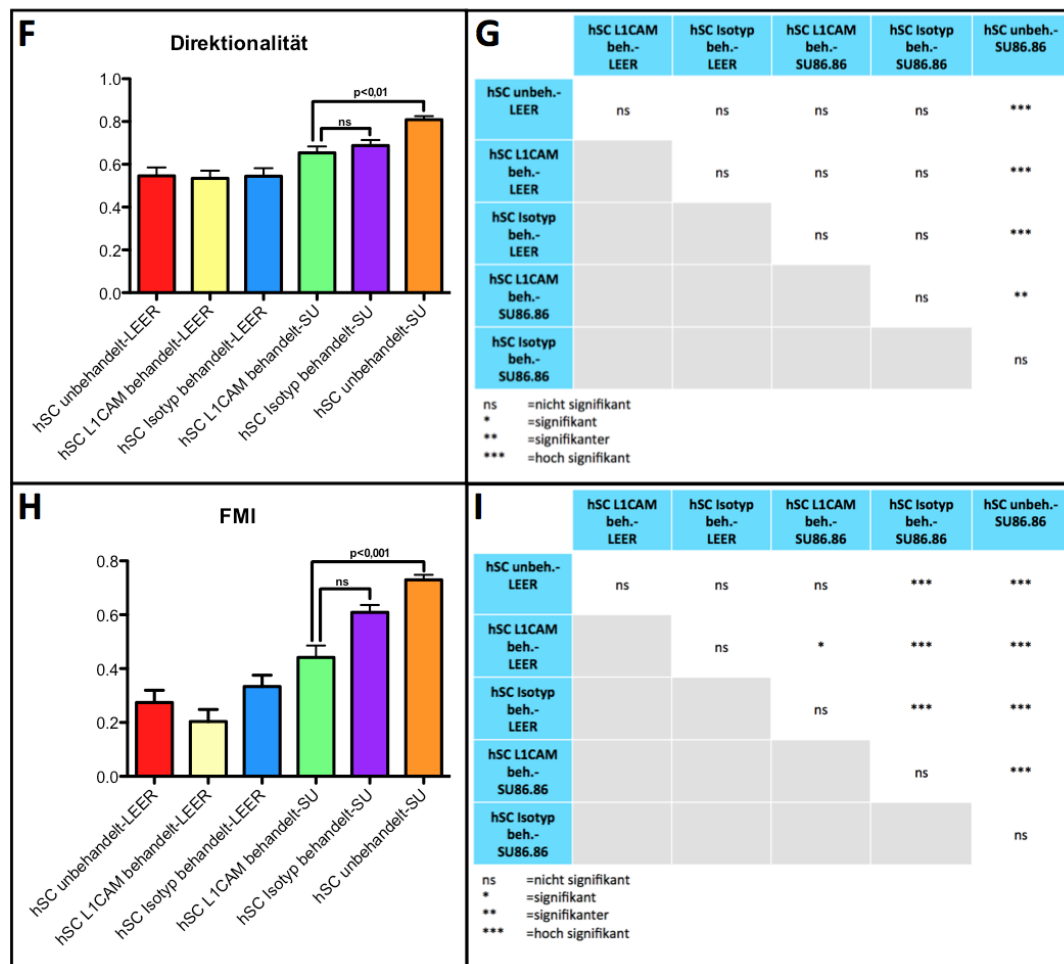


Abbildung 45: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten hSC:

F=quantitative Darstellung der Direktionalität der Zellmigration; G=tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen (multiples Vergleichsverfahren nach Dunn) von Graphik F; H=quantitative Darstellung des FMI der Zellen; I=tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen (multiples Vergleichsverfahren nach Dunn) von Graphik H (F=hSC unbehandelt-LEER: 0.55 ± 0.04 , hSC L1CAM behandelt-LEER: 0.54 ± 0.04 , hSC Isotyp behandelt-LEER: 0.54 ± 0.04 , hSC L1CAM behandelt-SU86.86: 0.65 ± 0.03 , hSC Isotyp behandelt-SU86.86: 0.69 ± 0.03 , hSC unbehandelt-SU86.86: 0.81 ± 0.02 ; H=hSC unbehandelt-LEER: 0.27 ± 0.05 , hSC L1CAM behandelt-LEER: 0.20 ± 0.05 , hSC Isotyp behandelt-LEER: 0.33 ± 0.04 , hSC L1CAM behandelt-SU86.86: 0.44 ± 0.04 , hSC Isotyp behandelt-SU86.86: 0.61 ± 0.03 , hSC unbehandelt-SU86.86: 0.73 ± 0.02)

Des Weiteren sollte aufgrund der Ergebnisse des Adhäsionsassays die Auswirkung von anti-L1CAM geblockten SU86.86 auf das Migrationsverhalten der hSC untersucht werden. Hierfür wurde ein 3D in-vitro Migrationsassay mit anti-L1CAM geblockten SU86.86 durchgeführt (Abb. 46, A). Für die statistischen Analysen wurden jeweils drei technische Replikate ausgewertet. Die statistischen Auswertungen (Abb. 46, B bis E) zeigten bezüglich der zellulären Durchschnittsgeschwindigkeit, der Zellmassenwanderung, der Direktionalität und des FMI das gleiche Ergebnis. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Front der unbehandelten hSC gegen die der anti-L1CAM behandel-

ten SU86.86 und der Front der unbehandelten hSC gegen die der Isotyp-Antikörper behandelten SU86.86 festgestellt werden. Allein die Front der unbehandelten hSC gegen das leere ECM-Gel war im Vergleich zu allen anderen Fronten in allen statistisch relevanten Parametern signifikant niedriger.

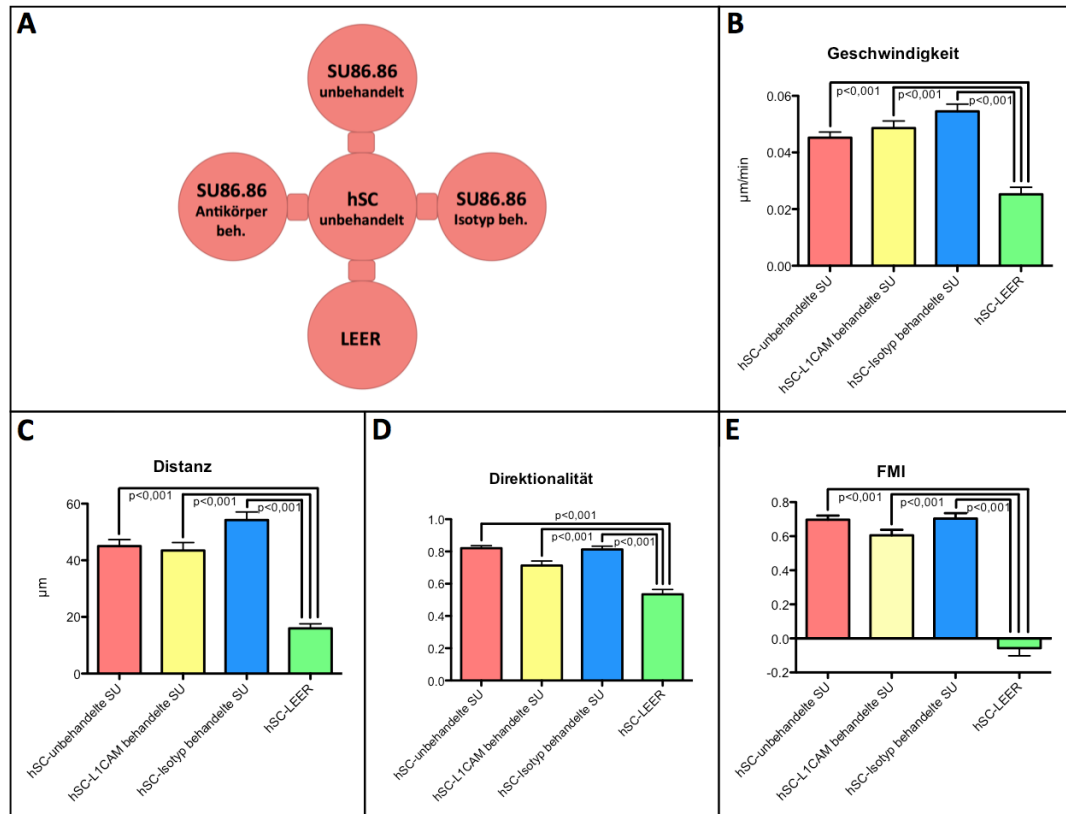


Abbildung 46: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten SU86.86: A=schematische Darstellung des Ansatzes; B=quantitative Darstellung der Geschwindigkeit der Zellmigration; C=quantitative Darstellung der von den Zellen zurückgelegten euklidischen Distanz; D=quantitative Darstellung der Direktionalität der Zellmigration; E=quantitative Darstellung des FMI der Zellen (B=hSC-unbehandelte SU86.86: 0.05 ± 0.002 µm/min, hSC-L1CAM behandelte SU86.86: 0.05 ± 0.003 µm/min, hSC-Isotyp behandelte SU86.86: 0.06 ± 0.003 µm/min, hSC-LEER: 0.03 ± 0.003 µm/min; C=hSC-unbehandelte SU86.86: 45.05 ± 2.27 µm, hSC-L1CAM behandelte SU86.86: 43.49 ± 2.77 µm, hSC-Isotyp behandelte SU86.86: 54.22 ± 2.87 µm, hSC-LEER: 15.95 ± 1.60 µm; D=hSC-unbehandelte SU86.86: 0.82 ± 0.02 , hSC-L1CAM behandelte SU86.86: 0.71 ± 0.03 , hSC-Isotyp behandelte SU86.86: 0.81 ± 0.02 , hSC-LEER: 0.54 ± 0.03 ; E=hSC-unbehandelte SU86.86: 0.70 ± 0.02 , hSC-L1CAM behandelte SU86.86: 0.61 ± 0.03 , hSC-Isotyp behandelte SU86.86: 0.70 ± 0.03 , hSC-LEER: -0.06 ± 0.05)

VI DISKUSSION

Die neurale Invasion (NI) ist einer der Hauptmetastasierungswege des PDAC. Bis heute ist immer noch unklar, wie die Pankreaskarzinomzellen (PCC) an die von den Schwannschen Zellen (hSC) umhüllten Axone anhaften und sich entlang derer ausbreiten können. Ziel der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war die Erforschung der potentiellen Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC, sowie die Identifizierung der Bedeutung der schwannzell-assoziierten Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM als Vermittler dieser Zell-Zell-Verbindung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NrCAM und L1CAM sowohl auf hSC, als auch auf intrapankreatischen Nerven reichlich vorhanden sind und folglich als Anhaftungsstelle fungieren können. L1CAM zeichnete sich durch eine besonders starke und spezifische Expression auf intrapankreatischen Nerven im PDAC aus. Das Expressionsmuster von NrCAM zeigte dagegen interessanterweise eine Umverteilung von einer spezifischen nervalen Expression im normalen Pankreasgewebe hin zu einer deutlichen Expression im PDAC-Bindegewebe. Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass es im Rahmen der NI zu einer bemerkenswerten Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC kommt, die hauptsächlich über L1CAM auf den PCC vermittelt wird. Die Blockade dieses Adhäsionsmoleküls auf den PCC führte jedoch zu keiner Veränderung der Chemoattraktion der hSC zu den PCC.

Bisher durchgeführte Studien im Bereich der NI während der Tumorprogression im Pankreaskarzinom konzentrierten sich auf die Interaktion zwischen Neuronen und Karzinomzellen. Bemerkenswerterweise existiert bisher eine einzige Studie, die den Gliazellen in diesem Zusammenhang eine beachtliche Rolle zugesprochen hat (Swanson, McDermott et al. 2007). Swanson et al. konnten erstmals nachweisen, dass Karzinomzellen über ihr Oberflächenmolekül MUC1 an das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) auf den hSC adhärieren können und auf diesem Weg entlang der Nerven invadieren können. Die vorliegende Dissertationsarbeit konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen das Wissen über die Interaktion zwischen hSC und PCC während der NI im PDAC erweitern und insbesondere L1CAM auf den PCC als einen potentiellen Interaktionspartner

identifizieren.

Erstaunlicherweise wurde die Möglichkeit der heterotypen Zell-Zell-Adhäsion im Rahmen der Untersuchung der NI im PDAC in bisher durchgeführten Studien nicht ausreichend berücksichtigt, obwohl die Adhäsion als eine der Grundvoraussetzungen des Metastasierungsprozesses gilt (Hanahan und Weinberg 2000; Nanda und St Croix 2004; Sahai 2007; Safuan, Storr et al. 2012; Zhang, Chen et al. 2012). Sowohl während der hämatogenen als auch während der lymphogenen Metastasierung benötigen Tumorzellen kontinuierliche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Guo und Giancotti 2004). In diesem Sinne sollte die NI als ähnlicher Adhäsionsprozess im Rahmen der Karzinomzellausbreitung berücksichtigt werden. Sobald die PCC den Nerven erreicht haben, stellt sich also die Frage, an welche Zellen diese adhären könnten. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass in bisherigen Studien primär die den Neuronen entstammenden Axone als potentielle Adhäsionsstellen betrachtet wurden, obwohl die die Nerven umhüllenden hSC eine räumliche Barriere zwischen den Axonen und den eindringenden PCC darstellen. Zudem wurde die potentielle Rolle der hSC im Rahmen der NI im PDAC durch neue, bisher nicht publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ceyhan noch bekräftigt. Diese Untersuchungen ergaben interessanterweise, dass die NI im Pankreaskarzinom nicht nur durch die Migration der PCC zu den neuronalen Strukturen charakterisiert ist, sondern auch durch eine zielgerichtete Migration der hSC zu den PCC. In dieser Studie wurde mittels eines 3D-Migrationsassays die Wechselwirkung zwischen hSC und PCC mit der Wechselwirkung zwischen hSC und verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien verglichen. Hier konnte einschlägig demonstriert werden, dass die hSC zielgerichtet zu den PCC – und nicht zu den Kolonkarzinomzellen - migrieren.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die zielgerichtete Migration der hSC zu den PCC unter Verwendung zusätzlicher Zelllinien auf ihre Spezifität hin überprüft werden. Als Analysemethode wurde das 3D-Migrationsassay genutzt (Ceyhan, Demir et al. 2008), welches die Möglichkeit bietet, Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelllinien *in vitro* nachzuahmen und computergestützt auszuwerten. Das Zellverhalten *in vitro* lässt deutliche Tendenzen erkennen und indirekt Rückschlüsse auf die Vorgänge *in vivo* zu. Die hSC wurden hierbei simultan einerseits mit PCC und andererseits mit einer anderen malignen Zelllinie, den Glioblastomzellen, oder mit einer benignen und der häufigsten

Bindegewebszellart im PDAC, den pankreatischen Sternzellen, konfrontiert. So war es möglich, die Spezifität der Migration der hSC zu den PCC *in vitro* zu charakterisieren. Interessanterweise migrierten die hSC im direkten Vergleich signifikant schneller und zielgerichteter zu den PCC als zu pankreatischen Sternzellen oder Glioblastomzellen. Dieses neue Erkenntnis unterstreicht die ausgeprägte Affinität der hSC zu den PCC, da weder benigne noch andere maligne Zelllinien eine vergleichbar starke Anziehung auf die hSC ausüben konnten. Es stellt sich nun die Frage, warum die hSC gerade spezifisch in Richtung der PCC migrieren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die Bildung einer schützenden Barriere zwischen PCC und dem gesunden neuronalen Gewebe durch die hSC sein. Andererseits könnte die Anziehung der hSC auch durch die Ausschüttung von chemotaktisch-neurotrophen Wachstumsfaktoren durch die Tumorzellen selbst zustande kommen (Zhu, Friess et al. 1999). Diese These ist vor allem vor dem Hintergrund, dass das Mikromilieu im PDAC durch einen Reichtum an neurotrophen Faktoren wie NGF, Neurotrophin-3, GDNF, Neurturin oder Artemin charakterisiert ist (Demir, Ceyhan et al. 2010), denkbar.

Es stellt sich die Frage durch welche Botenstoffe und Signalwege die Anziehung zwischen hSC und PCC ausgelöst wird. Neurotrophe Faktoren, wie NGF, Neurotrophine, GDNF, Neurturin, Persephin, Artemin oder das Chemokin Fraktalkin könnten in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle spielen. Fraktalkin und sein Rezeptor CX3CR1 vermitteln unter anderem die Interaktion zwischen Neuronen, Glia und Mikroglia (Meucci, Fatatis et al. 2000). Es konnte erstaunlicherweise nachgewiesen werden, dass die Expression von CX3CR1 im Pankreaskarzinom mit neuronaler Invasion und einer Ausbreitung der Tumorzellen entlang intra- und extrapankreatischer Nerven assoziiert ist (Marchesi, Locatelli et al. 2010). Zudem beeinflusst Fraktalkin die Expression von Adhäsionsmolekülen auf verschiedenen Zellen (Owlasiuk, Zajkowska et al. 2009). Dies ist ein potentieller Grund dafür, dass Glioblastomzellen eine geringere Anziehung auf die hSC ausüben als PCC, obwohl sie ebenfalls Fraktalkin und CX3CR1 exprimieren (Erreni, Solinas et al. 2010).

Des Weiteren stellt sich jedoch die Frage, ob die über NrCAM oder L1CAM vermittelte Zell-Zell-Adhäsion eine biologisch bedeutende Rolle spielt. Neuronale CAMs, wie NrCAM und L1CAM spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration (Schmid und Maness 2008). Eine reduzierte Expression von NrCAM

auf Glioblastomzellen ist bemerkenswerterweise mit einer verringerten Invasivität und Zellteilungsrate assoziiert (Sehgal, Ricks et al. 1999). Dementsprechend trägt die Expression von L1CAM auf Gliomzellen zu einer Erhöhung der Invasivität und Zellmigration bei und begünstigt damit die Metastasierung (Ohnishi, Matsumura et al. 1998). Die Überexpression von L1CAM auf verschiedenen Tumorentitäten, wie auf Ovarialtumoren, Kolonkarzinomen, Melanomen und Mammakarzinomen ist ebenfalls mit einer erhöhten Zellmotilität assoziiert (Gast, Riedle et al. 2005; Gavert, Conacci-Sorrell et al. 2005; Meier, Busch et al. 2006; Shtutman, Levina et al. 2006). Zudem fördert L1CAM die adhäsionsbedingte Aktivierung des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor-Signalweges *in vitro* und *in vivo* (Islam, Kristiansen et al. 2004). Der EGF-Rezeptor besitzt wiederum eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität, die letztendlich das Zellwachstum stimuliert und den programmierten Zelltod verhindert (Oda, Matsuoka et al. 2005). Dies könnte wiederum einen Anreiz darstellen, der zu einer Anziehung von Zellen führt.

Aufgrund dessen war es von großem Interesse, ob eine Korrelation zwischen der neuralen Expression von NrCAM und L1CAM mit der NI im PDAC besteht. Die Auswertung der neuralen Expression von NrCAM im Pankreaskarzinomgewebe ergab interessanterweise eine deutlich niedrigere Expression in den von Karzinomzellen befallenen Nerven. Dabei zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Nerven mit perineuraler und endoneuraler Invasion. Dies könnte einerseits auf die zunehmende Dedifferenzierung oder Migration der hSC aus den Nerven in das Pankreaskarzinomgewebe zurückzuführen sein. Andererseits könnte die Abnahme der Expression von NrCAM jedoch auch mit der Zerstörung der neuralen Integrität im Verlauf der NI im Zusammenhang stehen. Die immunhistochemische Analyse der neuralen Expression von L1CAM zeigte wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nerven mit und ohne NI. Damit ist eine Rolle von L1CAM in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht ausgeschlossen. Es ist denkbar, dass die Präsenz von L1CAM auf den hSC bzw. auf intrapankreatischen Nerven *per se* die heterotype Zell-Zell-Adhäsion im Rahmen der NI im PDAC überhaupt erst ermöglicht. Eine prometastatisch-proinvasive Rolle von L1CAM konnte bereits bei verschiedenen Tumorentitäten durch eindrucksvolle Studien mit Hilfe von L1CAM knock-out Experimenten bekräftigt werden, die unter anderem eine Assoziation zwischen L1CAM-Ex-

pression und einem verstärktem Tumorwachstum, sowie einer erhöhten Kapazität zur Metastasenbildung aufzeigen konnten (Gast, Riedle et al. 2005; Gavert, Sheffer et al. 2007; Gast, Riedle et al. 2008).

Der Einfluss dieses Adhäsionsmoleküls auf die Zell-Zell-Adhäsion zwischen PCC und hSC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels eines *in vitro* Adhäsionsassays überprüft. Mit der Hilfe von *in vitro* Modellen zur Untersuchung der NI konnten in zahlreiche Studien bereits aufschlussreiche Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkung zwischen PCC und neuronalen Strukturen erzielt werden (Dai, Li et al. 2007; Swanson, McDermott et al. 2007; Ceyhan, Demir et al. 2008; Marchesi, Piemonti et al. 2008; Gil, Cavel et al. 2010). Der Versuchsaufbau des in dieser Arbeit verwendeten Adhäsionsassays basiert auf einer bereits publizierten Version (Issa, Nummer et al. 2009). Für eine möglichst objektive Beurteilung wurden die Analysen mit zwei verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien (SU86.86 und MiaPaCa-2) durchgeführt. Die Analysen ergaben, dass durch die alleinige Blockade von L1CAM auf den hSC keine statistisch signifikante Beeinflussung der Zelladhäsion erreicht werden kann. Die Blockade von L1CAM auf den PCC führte dagegen erstaunlicherweise zu einer signifikant niedrigeren Adhäsion. Eine zusätzliche Behandlung der hSC mit anti-L1CAM zeigte allerdings keinen wesentlichen Effekt. L1CAM spielt damit eine bedeutende Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion im Rahmen der NI. Allerdings ist es bemerkenswert, dass die Expression von L1CAM in diesem Zusammenhang nicht, wie vermutet, auf den hSC, sondern vielmehr auf den PCC einen Effekt aufweist. Die L1CAM-Expression auf transmigrierenden Tumorzellen ist eine der Grundvoraussetzungen für die Migration von Zellen durch Endothel und damit für Metastasierung (Issa, Nummer et al. 2009). Die in dieser Studie überzeugend aufgezeigte L1CAM-vermittelte Adhäsion von Karzinomzellen an die hSC unterstreicht daher die Relevanz dieses Adhäsionsmoleküls im Rahmen der Tumorprogression im PDAC.

Aufgrund der Ergebnisse dieser funktionellen Analyse stellt sich nun insbesondere die Frage, welches Adhäsionsmolekül als Bindungspartner von L1CAM auf den hSC dienen könnte. Bisher nicht veröffentlichte Daten von Wang et al. ergaben, dass die NI im PDAC vornehmlich an myelinisierten Nerven stattfindet. Künftig sollten deshalb neben membranassoziierten Adhäsionsmolekülen (wie L1CAM und NrCAM) auch myelinassoziierte Adhäsionsmoleküle, wie zum Bei-

spiel Protein zero (P0) und MAG (Takeichi 1988; Payne, Hemperly et al. 1996; Derycke und Bracke 2004; Swanson, McDermott et al. 2007; Patil, Brock et al. 2011) im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen und als potentielle Bindungspartner berücksichtigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten umfangreichen Expressionsanalysen von NrCAM und L1CAM konnten das Wissen durch zahlreiche bisher durchgeführte Untersuchungen bestätigen und sogar noch bedeutend erweitern (Faissner, Teplow et al. 1985; Grumet, Mauro et al. 1991; Kayyem, Roman et al. 1992; Takeda, Asou et al. 1996; Fransen, Van Camp et al. 1997; Grumet 1997; Wang, Williams et al. 1998; Dhodapkar, Friedlander et al. 2001; Conacci-Sorrell, Ben-Yedidia et al. 2002; Ben, Wang et al. 2010; Chen, Lee et al. 2011; Tsutsumi, Morohashi et al. 2011). Die Existenz von NrCAM und L1CAM auf verschiedenen Passagen der hSC konnte in dieser Arbeit sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Dies ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass sowohl NrCAM als auch L1CAM essentielle Moleküle der Zellen darstellen, die aufgrund dessen auch noch auf hohen Passagen exprimiert werden. Die Analyse der Expression der beiden untersuchten Adhäsionsmoleküle in Abhängigkeit vom Gewebe ergab grundlegende Unterschiede. Interessanterweise sind NrCAM und L1CAM im Tumorgewebe komplett gegensätzlich reguliert. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von L1CAM im Rahmen der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Aussagen der dazu vorhandenen Literatur überein (Issa, Nummer et al. 2009; Tsutsumi, Morohashi et al. 2011). Unsere Untersuchung ergab eine spezifische L1CAM-Expression in den Nerven sowohl im normalen als auch im Pankreaskarzinomgewebe. Zudem konnten die Analysen von L1CAM im Nerven eine deutlich erhöhte Immunoreaktivität der Nerven im Pankreaskarzinomgewebe aufzeigen. Eine ähnliche Überexpression in intrapankreatischen Nerven im PDAC weist das Intermediärfilament-Protein Nestin auf (Ceyhan, Demir et al. 2009). Nestin gilt als Marker für Neuroplastizität (Michalczyk und Ziman 2005; Ceyhan, Demir et al. 2009; Besmer, Curry et al. 2011). Die Parallelen mit Nestin hinsichtlich der neuronalen Expression lassen vermuten, dass L1CAM ebenfalls mit Neuroplastizität im Pankreaskarzinom assoziiert ist. Unter neuronaler Plastizität versteht man die Fähigkeit von Nervenzellen in Abhängigkeit von äußeren und inneren Stimuli ihre Struktur zu ändern (Ganten 2004). Dies umfasst unterschiedliche Prozesse von vitaler Bedeutung, wie zum Beispiel die Verän-

derung dendritischer Funktionen, Langzeit-Potenzierung, axonale Aussprossung, Neuritenwachstum und Neurogenese (Fischer, Kunemund et al. 1986; Doherty und Walsh 1996; Yip und Siu 2001; Thelen, Kedar et al. 2002; Manji, Quiroz et al. 2003; Kulahin, Li et al. 2009). Im Pankreaskarzinom sind Neuroplastizität und NI eng miteinander verknüpft (Demir, Ceyhan et al. 2010). Folglich könnte L1CAM eine entscheidende Rolle bei der NI und der Neuroplastizität im Pankreaskarzinom spielen.

Die Expressionsanalysen zu NrCAM ergaben, wie bereits in der Literatur beschrieben (Dhodapkar, Friedlander et al. 2001), ein grundlegend unterschiedliches Expressionsmuster von NrCAM im normalen Gewebe im Vergleich zum Karzinomgewebe. Wie ebenfalls bereits von Dhodapkar et al. beschrieben, gelang auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Nachweis von NrCAM im Nerven. Dabei konnte jedoch erstmals eine spezifische Expression von NrCAM auf den Nerven in beiden Geweben aufgezeigt werden. Interessanterweise war die NrCAM-Expression der Nerven im Karzinomgewebe hochsignifikant niedriger als im normalen Gewebe. Folglich stellt sich die Frage, ob dieses Resultat eine Rolle von NrCAM bei der NI im PDAC ausschließt. Das Ergebnis ähnelt erheblich den Expressionsanalysen anderer glia-assoziiierter Proteine wie zum Beispiel p75 oder Sox10 im Pankreaskarzinom. Die neurale Expression dieser Proteine war, vergleichbar mit NrCAM, im Karzinomgewebe deutlich schwächer (Ceyhan, Demir et al. 2009; Wang, Zhao et al. 2009). Neben der Dedifferenzierung der aktivierten hSC kommt hier wiederum die migratorische Aktivität der hSC, wie sie durch neueste Analysen der Arbeitsgruppe Ceyhan gezeigt werden konnte, als eine mögliche Erklärung dieser schwächeren Expression in Frage. Andererseits könnte aber auch das vermehrte Shedding von NrCAM (Conacci-Sorrell, Kaplan et al. 2005) aus intrapankreatischen hSC zu dessen Anreicherung im Bindegewebe und damit zur schwächeren intraneuralen Detektion von NrCAM im PDAC führen. Bemerkenswerterweise war dabei die Immunoreaktivität von NrCAM im PDAC, am ehesten bedingt durch die starke Desmoplasie, erheblich prägnanter als im normalen Pankreasgewebe. Die Desmoplasie ist ein charakteristisches Merkmal des Pankreaskarzinoms (Erkan, Kleeff et al. 2007). Dieser übermäßigen Bindegewebsreaktion wird zunehmend eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms zugeschrieben (Duner, Lopatko Lindman et al. 2010). Studien haben bewiesen, dass die pankreatischen Stern-

zellen (PSC), die häufigsten Bindegewebszellen im PDAC, für die enorme Produktion von extrazellulärer Matrix während der Tumorprogression verantwortlich sind (Erkan, Kleeff et al. 2007; Vonlaufen, Phillips et al. 2008; Duner, Lopatko Lindman et al. 2010; Erkan, Adler et al. 2012). Zudem hat eine weitere Studie gezeigt, dass die NI der PCC vor allem in bindegewebsreichen Regionen des Pankreas abläuft (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Umso erstaunlicher ist es, dass NrCAM im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zwar erstmalig auf kultivierten PSC und den Bindegewebszellen (BJ) nachgewiesen werden konnte, jedoch nur in sehr geringem Maße. Dies könnte daran liegen, dass sich die PSC zum Zeitpunkt der Untersuchungen in einem nicht stimulierten Zustand befanden und dadurch nur geringe Mengen an NrCAM exprimierten. Eine andere Erklärung könnte die Existenz anderer Bindegewebszellen, wie zum Beispiel Myofibroblasten oder Fibrozyten sein, die größere Mengen an NrCAM exprimieren. So konnten Conacci-Sorrell et al. zeigen, dass retroviral vermittelte Transduktion von NrCAM in Fibroblasten das Zellwachstum stimuliert, die Zellmobilität verbessert und die Tumorgenese fördert (Conacci-Sorrell, Ben-Yedidia et al. 2002; Conacci-Sorrell, Kaplan et al. 2005). Angesichts der gegensätzlichen Expression von NrCAM in Abhängigkeit vom Gewebe, mit einer wesentlich geringeren Immunoreaktivität der Nerven und einer deutlich stärkeren Immunoreaktivität des Bindegewebes im Karzinomgewebe, muss berücksichtigt werden, dass die perineurale Barriere laut Bockmann et al. im PDAC aufgehoben ist (Bockman, Buchler et al. 1994). In diesem Kontext ist es denkbar, dass sich Zellen, die im normalen Pankreasgewebe NrCAM exprimieren, im PDAC aus dem nervalen Zellverband herausmigrieren und im umliegenden Bindegewebe zum Liegen kommen. Hierfür kommen neben hSC auch endoneurale Fibroblasten in Frage. Es ist von großem Interesse in künftigen Studien solche Zellen auf ihre potentielle Rolle als Adhäsionsstellen für PCC weiter zu untersuchen.

Neurale CAMs wie L1CAM sind unter anderem als Co-Rezeptoren wichtig für die neurale Migration und das Auswachsen von Axonen. Sie sind an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt und unterstützen Verknüpfungen des Zytoskelettes, die für die Motilität von Zellen wichtig sind (Schmid und Maness 2008). Die zytoplasmatische Domäne von L1CAM ermöglicht die Bindung an Ankyrin und damit eine Assoziation mit dem Zytoskelett (Garver, Ren et al. 1997). Nishimura et al. konnten zeigen, dass homophile Interaktionen der extra-

zellulären L1CAM-Domäne eine Assoziation von L1CAM mit Akyrin_B induzieren. Der dadurch bedingte retrograde Transport von F-Aktin baut die Zugkraft auf, die Voraussetzung für das L1CAM-vermittelte Auswachsen von Dendriten ist (Nishimura, Yoshihara et al. 2003). Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass L1CAM mit beta1-Integrinen interagiert und dadurch die neuronale Zellmigration verstärkt (Thelen, Kedar et al. 2002). Zudem interagiert L1CAM unter anderem mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, NCAM oder dem FGF (fibroblast growth factor)-Rezeptor und stimuliert so das Auswachsen von Neuriten (Heiland, Griffith et al. 1998; Yip, Zhao et al. 1998; Kulahin, Li et al. 2009). Eine andere Studie konnten wiederum belegen, dass die Expression von L1CAM auf Tumorendothelzellen die transendotheliale Migration und die Zelladhäsion von PCC verbessert (Issa, Nummer et al. 2009). Basierend auf dem Wissen dieser überzeugenden Studien stellt sich die Frage, ob L1CAM ebenfalls einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der hSC zu den PCC bei der NI im PDAC hat. Die statistische Auswertung der im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit durchgeführten Migrationsassays konnte jedoch erstaunlicherweise keinen Einfluss von L1CAM auf das Migrationsverhalten aufzeigen. Diesem Ergebnis zufolge hat die Expression von L1CAM weder auf den hSC noch auf den PCC eine Auswirkung auf die Migration der hSC im Rahmen der NI. Diese Erkenntnis könnte mit den Bindungseigenschaften von L1CAM im Zusammenhang stehen. CAMs, oder auch Zellbindungsmoleküle genannt, ermöglichen die Interaktion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix. L1CAM gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie, welche vornehmlich Zell-Zell-Kontakte vermittelt (Christen und Jaussi 2005). CAMs wie zum Beispiel die Integrine spielen dagegen nicht nur eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten, sondern sind ebenfalls entscheidend an Zell-Matrix-Kontakten beteiligt (Welsch und Sobotta 2006). Aufgrund dieser Eigenschaft haben die Integrine unter anderem eine wichtige Funktion bei der Zellwanderung während der Embryonalzeit (Welsch und Sobotta 2006). Die eingeschränkte Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten durch L1CAM könnte die Ursache dafür sein, dass die Expression von L1CAM keine Auswirkung auf die Migration der hSC in diesem Matrix-basierten Assay hat.

Die perineurale und endoneurale Invasion im PDAC steht in einem engen Zusammenhang mit den für diese Tumorerkrankung charakteristischen z.T. sehr starken neuropathischen Schmerzen (Ceyhan, Demir et al. 2009). Unter neuropathischen

Schmerzen versteht man einen chronischen Schmerzzustand, der durch periphere oder zentrale Nervenverletzungen oder auch durch Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, AIDS oder Karzinome hervorgerufen werden kann (Inoue und Tsuda 2009; Zhuo, Wu et al. 2011). Da über die pathologischen Mechanismen der neuropathischen Schmerzentstehung auf molekularer Ebene noch sehr wenig bekannt ist, mangelt es bis heute an einer effektiven Schmerzbehandlung (Zhuo, Wu et al. 2011). Studien weisen darauf hin, dass Gliazellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen spielen. Sie gehen eine enge Verbindung mit Neuronen ein und beeinflussen so die Schmerzübertragung, besonders unter pathologischen Bedingungen (Inoue und Tsuda 2009; McMahon und Malcangio 2009; Milligan und Watkins 2009). Zudem wird davon ausgegangen, dass abnormale Sprossung von sensorischen Nervenfasern und Reorganisation synaptischer Verschaltungen eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielen (Hoschouer, Yin et al. 2009). Dies gibt Grund zu der Annahme, dass Adhäsionsmoleküle, die unter physiologischen Bedingungen an der Ausbildung und Modifikation von Synapsen beteiligt sind, eine wichtige Rolle bei der Schmerzentstehung spielen können (Patil, Brock et al. 2011). Basierend auf diesem Wissen um die Entstehungsmechanismen neuropathischer Schmerzen, war die Untersuchung der schwannzell-assoziierten Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM von großem Interesse. Sowohl NrCAM als auch L1CAM tragen zum axonalen Wachstum, Orientierung und Faszikulation während der Entwicklung des Nervensystem, sowie zur Ausbildung und Plastizität von Synapsen bei (Fischer, Kunemund et al. 1986; Morales, Hubert et al. 1993; Doherty und Walsh 1996; Backer, Sakurai et al. 2002; Thelen, Kedar et al. 2002; Schmid und Maness 2008; Kulahin, Li et al. 2009). Es stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der neuronalen Expression von NrCAM bzw. L1CAM und Schmerz im PDAC besteht. Yamanaka et al. vermuteten bereits aufgrund ihrer Untersuchungen, dass eine veränderte Expression von L1CAM auf afferenten Neuronen zur Entstehung von neuropathischen Schmerzen beiträgt (Yamanaka, Obata et al. 2007). Die Untersucher konnten durch intrathekale Verabreichung von anti-L1CAM Antikörpern die durch die partielle Durchtrennung des Nervus ischiadicus bei Ratten induzierte mechanische Allodynie und thermische Hyperalgesie unterdrücken. Eine weitere Studie zeigte mit der Hilfe von L1CAM-Knockout-Mäusen, dass L1CAM eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung thermischer Hyperalgesie nach Rücken-

markverletzungen spielt. Dieses Phänomen wurde auf eine durch L1CAM implizierte Aussprossung von CGRP (calcitonin gene-related peptide)-haltigen Nervenfasern und eine Hochregulation der Expression von PKC (protein-kinase-C) gamma zurückgeführt (Hoschouer, Yin et al. 2009). Unsere Korrelationsanalysen ergaben interessanterweise eine tendenziell niedrigere Immunoreaktivität von NrCAM im Nerv bei Patienten mit Schmerzen als bei Patienten ohne Schmerzen. Die Analyse der L1CAM-Expression in Abhängigkeit vom Schmerzempfinden der Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Schmerzgruppen. Obwohl die Untersuchungsergebnisse keine eindeutige Korrelation zwischen der neuronalen Expression von NrCAM bzw. L1CAM und Schmerz im PDAC aufzeigen konnten, kann eine Beteiligung der beiden Adhäsionsmoleküle an der Schmerzentstehung im PDAC nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung bietet die bereits erwähnte migratorische Aktivität der hSC im PDAC. Es ist denkbar, dass es im Rahmen der Schmerzentstehung nicht zu einer erhöhten Expression, sondern vielmehr, wie bereits von Yamanaka et al. angedeutet, zu einer posttranskriptionalen Modifikation des Proteins kommt (Yamanaka, Obata et al. 2007). Hinsichtlich dessen wäre im Rahmen künftig folgender Studien eine Unterscheidung der verschiedenen Isoformen der Zelladhäsionsmoleküle von großem Interesse.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass es im Rahmen der NI im PDAC zu einer Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC kommt, bei der schwannzell-assoziierte Moleküle wie NrCAM und L1CAM potentielle Adhäsionsstellen zwischen diesen zwei Zellarten darstellen. Diese Adhäsion stellt einen bedeutenden pathophysiologischen Grundmechanismus in der NI im PDAC dar. Dieses Wissen bietet wiederum ein beachtliches therapeutisches Potential. Der Überprüfung dieser therapeutischen Möglichkeiten dienen insbesondere Modelle mit konditionalen Knockout-Mäusen, die NI aufweisen und bei denen im Rahmen der Untersuchungen diese Moleküle zeitlich und örtlich gesteuert ausgeschaltet werden können. So konnten in den letzten Jahren bereits einige Autoren das therapeutische Potential verschiedener L1CAM-spezifischer monoklonaler Antikörper bei unterschiedlichen Tumorentitäten aufzeigen (Primiano, Baig et al. 2003; Arlt, Novak-Hofer et al. 2006; Gast, Riedle et al. 2008; Novak-Hofer, Cohrs et al. 2008). In diesem Sinne könnte künftig eine intratumorale Blockade von schwannzell-assoziierten Molekülen wie NrCAM und L1CAM zu einer Reduktion der NI

und der damit assoziierten neuropathischen Schmerzen und hohen Lokalrezidivrate im PDAC beitragen.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland und weist mit einer relativen Fünfjahresüberlebensrate von 7 bis 8% die niedrigste Überlebensrate unter allen Tumorerkrankungen auf. Neuere Studien zeigen, dass die neurale Invasion (NI) im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) mit Tumorprogression, Lokalrezidiven und neuropathischen Schmerzen assoziiert ist. Die NI gilt als bedeutender Metastasierungsweg des PDAC. Bisher war es jedoch unklar, an welchen Strukturen innerhalb der Nerven die Pankreaskarzinomzellen (PCC) im Rahmen ihrer Ausbreitung anhaften. Ziel der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war die Erforschung der potentiellen Zell-Zell-Adhäsion zwischen humanen Schwannschen Zellen (hSC) und PCC, sowie die Charakterisierung der Bedeutung der schwannzell-assoziierten Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und L1CAM als Vermittler dieser Zell-Zell-Verbindung. Es konnte gezeigt werden, dass NrCAM und L1CAM nicht nur auf hSC, sondern auch auf intrapankreatischen Nerven reichlich vorhanden sind und folglich eine potentielle Anhaftungsstelle für PCC darstellen. Dabei war die durchschnittliche relative Expression auf hSC von L1CAM etwa 6-mal so hoch wie die von NrCAM. Die Analysen ergaben, dass sich L1CAM durch eine besonders starke und spezifische Expression auf intrapankreatischen Nerven im PDAC auszeichnet. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass L1CAM mit Neuroplastizität im PDAC assoziiert ist. Interessanterweise zeigte NrCAM dagegen eine Umverteilung von einer spezifischen nervalen Expression im normalen Pankreasgewebe hin zu einer deutlichen Expression im Bindegewebe im PDAC. Die funktionellen Untersuchungen zeigten erstaunlicherweise, dass es im Rahmen der NI zu einer bemerkenswerten Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC kommt, die hauptsächlich über L1CAM auf den PCC vermittelt wird. Jedoch hatten beide Moleküle keinen Einfluss auf das nerv-gerichtete Migrationsverhalten der PCC oder der hSC.

Zusammengefasst konnte die vorliegende Dissertationsarbeit aufzeigen, dass es im Rahmen der NI im PDAC zu einer Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und PCC kommt, bei der schwannzell-assoziierte Moleküle wie NrCAM und L1CAM

potentielle Adhäsionsstellen zwischen diesen zwei Zellarten darstellen. Diese Adhäsion stellt einen bedeutenden pathophysiologischen Grundmechanismus in der NI im PDAC dar. Erlangtes Wissen bietet ein beachtliches therapeutisches Potential, durch das künftig zum Beispiel in Form von einer intratumoralen Blockade von schwannzell-assoziierten Molekülen wie NrCAM und L1CAM eine Reduktion der NI und der damit assoziierten neuropathischen Schmerzen und hohen Lokalrezidivrate im PDAC möglich sein könnte.

VIII SUMMARY

On the role of the Schwann cell associated cell adhesion molecules NrCAM and L1CAM in neural cancer cell invasion in pancreatic carcinoma

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth most common cause of cancer-related death in Germany. With a 5-year overall survival of merely 7-8%, it demonstrates the lowest survival rate among all human malignancies. Recent studies showed that neural invasion (NI) in PDAC is associated with tumor progression, local recurrence and neuropathic abdominal pain. NI is one of the major routes of metastasis in PDAC. However, it was so far unknown to which structures within nerves pancreatic cancer cells (PCC) adhere for their spread. The aim of this study was to investigate the potential cell-cell-adhesion between human Schwann cells (hSC) and PCC and to characterize the role of the hSC associated cell adhesion molecules NrCAM and L1CAM as mediators of this process. Here, it was shown that NrCAM and L1CAM are abundantly present not only on hSC but also in intrapancreatic nerves and thus serve as adhesion sites for PCC. The mean relative expression of L1CAM on hSC was around 6 times as high that of NrCAM. Interestingly, L1CAM was particularly and specifically detectable in intrapancreatic nerves in PDAC samples. This observation suggests that L1CAM may be related to pancreatic neuroplasticity in PDAC. Conversely, NrCAM exhibited a redistribution from its strong presence in nerves in normal pancreas towards a prominent presence in desmoplastic tissue areas in PDAC. The functional studies showed that NI is characterized by cell-cell-adhesion between PCC and hSC, which is mainly mediated by the surface molecule L1CAM on PCC. However, both studied molecules had no impact upon NI by cancer cells or hSC migration towards PCC.

In summary, this dissertation could demonstrate that NI in PDAC is characterized by a cell-cell-adhesion between hSC and PCC. Schwann cell associated surface molecules like NrCAM and L1CAM can serve as mediators of this adhesion between these two cell types. The heterotypic cell-cell-adhesion in NI can be regarded as a key pathophysiological mechanism in NI in PDAC. This mechanism

can be exploited for therapeutic approaches such as (antibody-mediated) intratumoral blockade of these receptors on hSC in order to achieve attenuation of NI, neuropathic pain and local recurrence in PDAC.

IX LITERATURVERZEICHNIS

ACS (2011). Cancer Facts and Figures 2011. Atlanta, American Cancer Society: 58.

Adler, G., T. Seufferlein, et al. (2007). "Pankreaskarzinom: Kurzfassung der S3-Leitlinien 2007." Dtsch Med Wochenschr **132**: 1696-1700.

Anderson, N. V. und K. H. Johnson (1967). "Pancreatic carcinoma in the dog." J Am Vet Med Assoc **150**(3): 286-295.

Angst, B. D., C. Marcozzi, et al. (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." J Cell Sci **114**(Pt 4): 629-641.

Aplin, A. E., A. Howe, et al. (1998). "Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins." Pharmacol Rev **50**(2): 197-263.

Apte, M. V., P. S. Haber, et al. (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut **43**(1): 128-133.

Arends, J., G. Zürcher, et al. (2003). DGEM-Leitlinie Enterale Ernährung: Onkologie. Aktuel Ernaehr Med. **28**: 61-68.

Arlt, M. J., I. Novak-Hofer, et al. (2006). "Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment." Cancer Res **66**(2): 936-943.

Aydin, Y., M. K. Borkü, et al. (2003). "Poorly Differentiated Pancreatic Carcinoma Associated with Partial Alopecia in a Cat." Turk L Vet Anim Sci **27**: 7.

Bachem, M. G., E. Schneider, et al. (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." Gastroenterology **115**(2): 421-432.

Backer, S., T. Sakurai, et al. (2002). "Nr-CAM and TAG-1 are expressed in distinct populations of developing precerebellar and cerebellar neurons." Neuroscience **113**(4): 743-748.

Balmain, A. und C. C. Harris (2000). "Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes." Carcinogenesis **21**(3): 371-377.

Banner, B. F., J. Alroy, et al. (1979). "Acinar cell carcinoma of the pancreas in a cat." Vet Pathol **16**(5): 543-547.

Banner, B. F., J. Alroy, et al. (1978). "An ultrastructural study of acinic cell carcinomas of the canine pancreas." Am J Pathol **93**(1): 165-182.

Ben, Q. W., J. C. Wang, et al. (2010). "Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma." Annals Surggical Oncology **17**(8): 2213-2221.

Bennett, P. F., K. A. Hahn, et al. (2001). "Ultrasonographic and cytopathological diagnosis of exocrine pancreatic carcinoma in the dog and cat." J Am Anim Hosp Assoc **37**(5): 466-473.

Berrington de Gonzalez, A., S. Sweetland, et al. (2003). "A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer." Br J Cancer **89**(3): 519-523.

Besmer, D. M., J. M. Curry, et al. (2011). "Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis." Cancer Research **71**(13): 4432-4442.

Birth, M. (2010). Hepatobiliäre und Pankreastumoren. Berlin; Heidelberg; New York, NY, Springer.

Bockman, D. E., M. Buchler, et al. (1994). "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." Gastroenterology **107**(1): 219-230.

Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-4689.

Bright, J. M. (1985). "Pancreatic adenocarcinoma in a dog with a maldigestion syndrome." J Am Vet Med Assoc **187**(4): 420-421.

Brummendorf, T. und F. G. Rathjen (1993). "Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction." J Neurochem **61**(4): 1207-1219.

Brunner, E. (2013). Zur Rolle von beta 1 Integrin und Neural cell adhesion molecule (NCAM) in der heterotypen Schwannzell-Tumorzell-Adhäsion im Pankreaskarzinom, Ludwig-Maximilians-Universität.

Capecchi, M. R. (1989). "Altering the genome by homologous recombination." Science **244**(4910): 1288-1292.

Capecchi, M. R. (1989). "The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting." Trends Genet **5**(3): 70-76.

Cavallaro, U. und G. Christofori (2001). "Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough." Biochim Biophys Acta **1552**(1): 39-45.

Cavallaro, U. und G. Christofori (2004). "Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules." Ann N Y Acad Sci **1014**: 58-66.

Ceyhan, G., M. Müller, et al. (2005). Der neurotrophische Wachstumsfaktor Artemin induziert eine Steigerung der Krebszellinvasion im Pankreaskarzinom. Chirurgisches Forum 2005. M. Rothmund, K. W. Jauch und H. Bauer, Springer Berlin Heidelberg. **34**: 63-64.

Ceyhan, G. O., F. Bergmann, et al. (2009). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain-a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." Gastroenterology **136**(1): 177-186 e171.

Ceyhan, G. O., F. Bergmann, et al. (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." Gut **56**(4): 534-544.

Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochemical Biophysical Research Communications **374**(3): 442-447.

Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2009). "Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **104**(10): 2555-2565.

Ceyhan, G. O., N. A. Giese, et al. (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Annals of Surgery **244**(2): 274-281.

Chari, S. T., C. L. Leibson, et al. (2005). "Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study." Gastroenterology **129**(2): 504-511.

Chen, M. M., C. Y. Lee, et al. (2011). "Modification of the L1-CAM carboxy-terminus in pancreatic adenocarcinoma cells." Tumour Biol **32**(2): 347-357.

Christen, P. und R. Jaussi (2005). Biochemie. Berlin [u.a.], Springer.

Christoph, H.-J. (2007). Klinik der Hundekrankheiten. Stuttgart, Enke.

Cobb, L. F. und R. C. Merrell (1984). "Total pancreatectomy in dogs." J Surg Res **37**(3): 235-240.

Conacci-Sorrell, M., A. Kaplan, et al. (2005). "The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation." Cancer Res **65**(24): 11605-11612.

Conacci-Sorrell, M. E., T. Ben-Yedidia, et al. (2002). "Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis." Genes Dev **16**(16): 2058-2072.

Crossin, K. L. und L. A. Krushel (2000). "Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Dev Dyn **218**(2): 260-279.

Cruveilhier, J. (1835). Maladie des nerfs. Anatomie pathologique du corps humain: descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris, J.B. Balliere.

Dai, H., R. Li, et al. (2007). "Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach." Hum Pathol **38**(2): 299-307.

Debiec, H., E. I. Christensen, et al. (1998). "The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis." J Cell Biol **143**(7): 2067-2079.

Delpu, Y., N. Hanoun, et al. (2011). "Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis." Curr Genomics **12**(1): 15-24.

Demir, I. E., G. O. Ceyhan, et al. (2010). "Neural Invasion in Pancreatic Cancer: The Past, Present and Future." Cancers(2): 1513-1527.

Dennis, M. M., T. D. O'Brien, et al. (2008). "Hyalinizing pancreatic adenocarcinoma in six dogs." Vet Pathol **45**(4): 475-483.

Derycke, L. D. und M. E. Bracke (2004). "N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling." Int J Dev Biol **48**(5-6): 463-476.

Dhodapkar, K. M., D. Friedlander, et al. (2001). "Differential expression of the cell-adhesion molecule Nr-CAM in hyperplastic and neoplastic human pancreatic tissue." Hum Pathol **32**(4): 396-400.

DiMagno, E. P., H. A. Reber, et al. (1999). "AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association." Gastroenterology **117**(6): 1464-1484.

Doherty, P. und F. S. Walsh (1996). "CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth." Mol Cell Neurosci **8**(2/3): 99-111.

Duner, S., J. Lopatko Lindman, et al. (2010). "Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression." Pancreatology **10**(6): 673-681.

Ekoe, J. M., P. Ghadirian, et al. (1992). "Diabetes mellitus and pancreatic cancer: a case-control study in greater Montreal, Quebec, Canada." Rev Epidemiol Sante Publique **40**(6): 447-453.

Elangbam, C. S., C. W. Qualls, Jr., et al. (1997). "Cell adhesion molecules-update." Vet Pathol **34**(1): 61-73.

Engelhardt, W. v. (2009). Physiologie der Haustiere. Stuttgart, Enke.

Erkan, M., G. Adler, et al. (2012). "StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research." Gut **61**(2): 172-178.

Erkan, M., J. Kleeff, et al. (2007). "Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity." Gastroenterology **132**(4): 1447-1464.

Erreni, M., G. Solinas, et al. (2010). "Human glioblastoma tumours and neural cancer stem cells express the chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1." Eur J Cancer **46**(18): 3383-3392.

Ettinger, S. J. und E. C. Feldman (2010). Textbook of veterinary internal medicine/2. disease of the dog and the cat. Philadelphia, Saunders.

Faissner, A., D. B. Teplow, et al. (1985). "Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1." EMBO J **4**(12): 3105-3113.

Falconer, J. S., K. C. Fearon, et al. (1995). "Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer." Cancer **75**(8): 2077-2082.

Fazal, S. und M. W. Saif (2007). "Supportive and palliative care of pancreatic cancer." JOP **8**(2): 240-253.

Fischer, G., V. Kunemund, et al. (1986). "Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1." J Neurosci **6**(2): 605-612.

Fogel, M., P. Gutwein, et al. (2003). "L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas." Lancet **362**(9387): 869-875.

Fossum, T. W. (2007). Chirurgie der Kleintiere. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.

Fransen, E., G. Van Camp, et al. (1997). "L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite." Hum Mol Genet **6**(10): 1625-1632.

Friedman, S. L. und F. J. Roll (1987). "Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan." Anal Biochem **161**(1): 207-218.

Friess, H., J. Kleeff, et al. (2003). "[Surgical standard therapy for cancer of the pancreas]." Chirurg **74**(3): 183-190.

Frohman, M. A. und G. R. Martin (1989). "Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice." Cell **56**(2): 145-147.

Ganten, D. (2002). Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen. Berlin [u.a.], Springer.

Ganten, D. (2004). Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen. Berlin [u.a.], Springer.

Garabrant, D. H., J. Held, et al. (1992). "DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer." J Natl Cancer Inst **84**(10): 764-771.

Garver, T. D., Q. Ren, et al. (1997). "Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin." J Cell Biol **137**(3): 703-714.

Garvey, M. S. und D. A. Zawie (1984). "Feline pancreatic disease." Vet Clin North Am Small Anim Pract **14**(6): 1231-1246.

Gast, D., S. Riedle, et al. (2008). "The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies." Oncogene **27**(9): 1281-1289.

Gast, D., S. Riedle, et al. (2005). "L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas." Int J Cancer **115**(4): 658-665.

Gavert, N., M. Conacci-Sorrell, et al. (2005). "L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers." J Cell Biol **168**(4): 633-642.

Gavert, N., M. Sheffer, et al. (2007). "Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis." Cancer Res **67**(16): 7703-7712.

Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." Semin Liver Dis **21**(3): 311-335.

Gil, Z., O. Cavel, et al. (2010). "Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves." J Natl Cancer Inst **102**(2): 107-118.

Grumet, M. (1997). "Nr-CAM: a cell adhesion molecule with ligand and receptor functions." Cell Tissue Res **290**(2): 423-428.

Grumet, M., V. Mauro, et al. (1991). "Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules." J Cell Biol **113**(6): 1399-1412.

Guo, W. und F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-826.

Hahn, S. A., S. E. Kern, et al. (1997). "Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus: der Pankreaskarzinom- Forschung. Diagnostische und therapeutische Perspektiven." Dtsch Arztebl **94**: 49.

Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hänichen, T. und G. Minkus (1990). "Retrospektive Studie zur Pathologie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas bei Hund und Katze." Tierärztliche Umschau **45**: 363-368.

Heiland, P. C., L. S. Griffith, et al. (1998). "Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth." Eur J Cell Biol **75**(2): 97-106.

Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, et al. (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **20**(10): 1218-1249.

Hilbig, A. und H. Oettle (2010). "Adjuvant therapy of pancreatic cancer." Expert Rev Anticancer Ther **10**(4): 485-491.

Hlavin, M. L. und V. Lemmon (1991). "Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison." Genomics **11**(2): 416-423.

Horzinek, M. C. (2005). Krankheiten der Katze. Stuttgart, Enke.

Hoschouer, E. L., F. Q. Yin, et al. (2009). "L1 cell adhesion molecule is essential for the maintenance of hyperalgesia after spinal cord injury." Exp Neurol **216**(1): 22-34.

Humphries, M. J. (2000). "Integrin structure." Biochem Soc Trans **28**(4): 311-339.

Inoue, K. und M. Tsuda (2009). "Microglia and neuropathic pain." Glia **57**(14): 1469-1479.

Islam, R., L. V. Kristiansen, et al. (2004). "Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions." Mol Biol Cell **15**(4): 2003-2012.

Issa, Y., D. Nummer, et al. (2009). "Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration." J Mol Med (Berl) **87**(1): 99-112.

Jentzer, A. (1930). "Neurotropisme des cellules cancéreuses: Clinique et thérapeutique des cancers neurotropes." Schweiz. Med. Wochenschr. **60**: 1050–1052.

Ji, B. T., D. T. Silverman, et al. (2001). "Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer." Am J Ind Med **39**(1): 92-99.

Kaatsch, P., C. Spix, et al. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. R. Koch-Institut und G. e.V. Berlin. **135 S.**

Kayahara, M., T. Nagakawa, et al. (1995). "Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head area based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion." Surgery **117**(6): 616-623.

Kayahara, M., H. Nakagawara, et al. (2007). "The nature of neural invasion by pancreatic cancer." Pancreas **35**(3): 218-223.

Kayyem, J. F., J. M. Roman, et al. (1992). "Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure." J Cell Biol **118**(5): 1259-1270.

Kessler, M. (2005). Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Stuttgart, Parey.

Kodera, Y., H. Nakanishi, et al. (2009). "Expression of L1 cell adhesion molecule is a significant prognostic factor in pT3-stage gastric cancer." Anticancer Res **29**(10): 4033-4039.

Kowitz, A., G. Kadmon, et al. (1992). "Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes." Eur J Immunol **22**(5): 1199-1205.

Kraft, W., U. M. Dürr, et al. (2003). Katzenkrankheiten. Klinik und Therapie Band 2. Hannover, Schaper.

Krams, M. (2010). Kurzlehrbuch Pathologie. Stuttgart [u.a.], Thieme.

Kulahin, N., S. Li, et al. (2009). "Identification of neural cell adhesion molecule L1-derived neuritogenic ligands of the fibroblast growth factor receptor." J Neurosci Res **87**(8): 1806-1812.

Lamb, C. R., K. W. Simpson, et al. (1995). "Ultrasonography of pancreatic neoplasia in the dog: a retrospective review of 16 cases." Vet Rec **137**(3): 65-68.

Lee, V., H. Cheng, et al. (2012). "Quality of life in patients with pancreatic cancer." JOP **13**(2): 182-184.

Lillemoe, K. D., J. L. Cameron, et al. (1993). "Chemical splanchnicectomy in patients with unresectable pancreatic cancer. A prospective randomized trial." Ann Surg **217**(5): 447-455; discussion 456-447.

Lillemoe, K. D., C. J. Yeo, et al. (2000). "Pancreatic cancer: state-of-the-art care." CA Cancer J Clin **50**(4): 241-268.

Liu, B. und K. Y. Lu (2002). "Neural invasion in pancreatic carcinoma." Hepatobiliary and Pancreat Diseases International **1**(3): S.469-S.476.

Lowenfels, A. B. und P. Maisonneuve (2004). "Epidemiology and prevention of pancreatic cancer." Jpn J Clin Oncol **34**(5): 238-244.

Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, et al. (1993). "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group." N Engl J Med **328**(20): 1433-1437.

Makino, I., H. Kitagawa, et al. (2008). "Nerve Plexus Invasion in Pancreatic Cancer: Spread Patterns on Histopathologic and Embryological Analyses." Pancreas.

Manji, H. K., J. A. Quiroz, et al. (2003). "The underlying neurobiology of bipolar disorder." World Psychiatry **2**(3): 136-146.

Marchesi, F., M. Locatelli, et al. (2010). "Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer." J Neuroimmunol **224**(1-2): 39-44.

Marchesi, F., L. Piemonti, et al. (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Research **68**(21): 9060-9069.

Matsuda, M. und Y. Nimura (1983). "[Perineural invasion of pancreas head carcinoma]." Nihon Geka Gakkai Zasshi **84**(8): 719-728.

Mauro, V. P., L. A. Krushel, et al. (1992). "Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule." J Cell Biol **119**(1): 191-202.

Mazur, P. K. und J. T. Siveke (2011). "Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology." Gut.

McGavin, D. M. und J. F. Zachary (2009). Pathologie der Haustiere. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. München, Urban & Fischer, Elsevier.

McMahon, S. B. und M. Malcangio (2009). "Current challenges in glia-pain biology." Neuron **64**(1): 46-54.

Mechtersheimer, S., P. Gutwein, et al. (2001). "Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins." J Cell Biol **155**(4): 661-673.

Meier, F., S. Busch, et al. (2006). "The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression." Int J Cancer **119**(3): 549-555.

Meucci, O., A. Fatatis, et al. (2000). "Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8075-8080.

Meyer, W., C. Jurowich, et al. (2000). "Pathomorphological and histological prognostic factors in curatively resected ductal adenocarcinoma of the pancreas." Surg Today **30**(7): 582-587.

Michalczyk, K. und M. Ziman (2005). "Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation." Histol Histopathol **20**(2): 665-671.

Milligan, E. D. und L. R. Watkins (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." Nat Rev Neurosci **10**(1): 23-36.

Miyahara, R., F. Tanaka, et al. (2001). "Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state." J Surg Oncol **77**(1): 49-54.

Moos, M., R. Tacke, et al. (1988). "Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin." Nature **334**(6184): 701-703.

Morales, G., M. Hubert, et al. (1993). "Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo." Neuron **11**(6): 1113-1122.

Moulton, J. E. (1978). Tumors of the pancreas, liver, gall bladder and mesothelium. Tumors in domestic animals. second edition. J. E. Moulton. Los Angeles, University of California Press: 18 S.

Muscat, J. E., S. D. Stellman, et al. (1997). "Smoking and pancreatic cancer in men and women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(1): 15-19.

Nagakawa, T., M. Kayahara, et al. (1992). "Clinicopathological study on neural invasion to the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." Hepatogastroenterology **39**(1): 51-55.

Nakao, A., A. Harada, et al. (1996). "Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." Pancreas **12**(4): 357-361.

Nanda, A. und B. St Croix (2004). "Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy." Curr Opin Oncol **16**(1): 44-49.

Nelson, R. W. (2010). Innere Medizin der Kleintiere. München, Elsevier, Urban & Fischer.

Nishimura, K., F. Yoshihara, et al. (2003). "L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow." J Cell Biol **163**(5): 1077-1088.

Novak-Hofer, I., S. Cohrs, et al. (2008). "Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells." Cancer Lett **261**(2): 193-204.

Oda, K., Y. Matsuoka, et al. (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." Mol Syst Biol **1**: 2005 0010.

Oettle, H., S. Post, et al. (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." JAMA **297**(3): 267-277.

Ohnishi, T., H. Matsumura, et al. (1998). "A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture." Cancer Res **58**(14): 2935-2940.

Owłasiuk, P., J. M. Zajkowska, et al. (2009). "[Fractalkine--structure, functions and biological activity]." Pol Merkur Lekarski **26**(153): 253-257.

Patil, S. B., J. H. Brock, et al. (2011). "Neuropathic pain- and glial derived neurotrophic factor-associated regulation of cadherins in spinal circuits of the dorsal horn." Pain **152**(4): 924-935.

Pavone, S., E. Manuali, et al. (2011). "Canine pancreatic clear acinar cell carcinoma showing an unusual mucinous differentiation." J Comp Pathol **145**(4): 355-358.

Payne, H. R., J. J. Hemperly, et al. (1996). "N-cadherin expression and function in cultured oligodendrocytes." Brain Res Dev Brain Res **97**(1): 9-15.

Pelzer, U., D. Arnold, et al. (2010). "Parenteral nutrition support for patients with pancreatic cancer. Results of a phase II study." BMC Cancer **10**: 86.

Priester, W. A. (1974). "Data from eleven United States and Canadian colleges of veterinary medicine on pancreatic carcinoma in domestic animals." Cancer Res **34**(6): 1372-1375.

Primiano, T., M. Baig, et al. (2003). "Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements." Cancer Cell **4**(1): 41-53.

Rathjen, F. G. und M. Schachner (1984). "Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion." EMBO J **3**(1): 1-10.

Reni, M. (2012). "Evidences and Opinions for Adjuvant Therapy in Pancreatic Cancer." Curr Drug Targets.

Resor, L., T. J. Bowen, et al. (2001). "Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis." Hum Mol Genet **10**(7): 669-675.

Rivenson, A., D. Hoffmann, et al. (1988). "Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived N-nitrosamines." Cancer Res **48**(23): 6912-6917.

Rowlatt, U. (1967). "Spontaneous epithelial tumours of the pancreas of mammals." Br J Cancer **21**(1): 82-107.

Royer, C. (2001). Simultane Optimierung von Produktionsstandorten, Produktionsmengen und Distributionsgebieten. München, Utz, Wiss.

Safuan, S., S. J. Storr, et al. (2012). "A comparative study of adhesion of melanoma and breast cancer cells to blood and lymphatic endothelium." Lymphat Res Biol **10**(4): 173-181.

Sahai, E. (2007). "Illuminating the metastatic process." Nat Rev Cancer **7**(10): 737-749.

Saotome, T., H. Inoue, et al. (1997). "Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini." Pancreas **14**(4): 373-382.

Schmid, R. S. und P. F. Maness (2008). "L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth." Curr Opin Neurobiol **18**(3): 245-250.

Seaman, R. L. (2004). "Exocrine pancreatic neoplasia in the cat: a case series." J Am Anim Hosp Assoc **40**(3): 238-245.

Seeber, S. (2003). Therapiekonzepte Onkologie. Berlin [u.a.], Springer.

Sehgal, A., S. Ricks, et al. (1999). "Antisense human neuroglia related cell adhesion molecule hNr-CAM, reduces the tumorigenic properties of human glioblastoma cells." Anticancer Res **19**(6B): 4947-4953.

Sharfman, W. H. und T. D. Walsh (1990). "Has the analgesic efficacy of neurolytic celiac plexus block been demonstrated in pancreatic cancer pain?" Pain **41**(3): 267-271.

Shi, C., R. H. Hruban, et al. (2009). "Familial pancreatic cancer." Arch Pathol Lab Med **133**(3): 365-374.

Shin, E. J. und M. I. Canto (2012). "Pancreatic cancer screening." Gastroenterol Clin North Am **41**(1): 143-157.

Shtutman, M., E. Levina, et al. (2006). "Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells." Cancer Res **66**(23): 11370-11380.

Simon, B. und H. Printz (2001). "Epidemiological trends in pancreatic neoplasias." Dig Dis **19**(1): 6-14.

Staats, P. S., H. Hekmat, et al. (2001). "The effects of alcohol celiac plexus block, pain, and mood on longevity in patients with unresectable pancreatic cancer: a double-blind, randomized, placebo-controlled study." Pain Med **2**(1): 28-34.

Steiner, J. M. (2011). Gastroenterologie bei Hund und Katze. Klinik, Diagnostik, Therapie. Hannover, Schlütersche.

Swanson, B. J., K. M. McDermott, et al. (2007). "MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion." Cancer Res **67**(21): 10222-10229.

Takahashi, T., H. Ishikura, et al. (1997). "Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas." J Surg Oncol **65**(3): 164-170.

Takeda, Y., H. Asou, et al. (1996). "A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis." J Neurochem **66**(6): 2338-2349.

Takeichi, M. (1988). "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis." Development **102**(4): 639-655.

Thelen, K., V. Kedar, et al. (2002). "The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins." J Neurosci **22**(12): 4918-4931.

ThermoFisherScientific. (2012). "Spectra Multicolor High Range Protein Ladder." from <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=71836B61-EF01-E69A-A311-D5A8F491CB69>.

Thies, A., M. Schachner, et al. (2002). "Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma." Eur J Cancer **38**(13): 1708-1716.

Tsutsumi, S., S. Morohashi, et al. (2011). "L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma." Journal of Surgical Oncology **103**(7): 669-673.

Vincent, A., J. Herman, et al. (2011). "Pancreatic cancer." Lancet **378**(9791): 607-620.

Volker Keim, Ernst Klar, et al. (2009). "Der pankreasoperierte Patient. Nachsorge, Diagnostik und Therapie." Dtsch Arztebl Int **48**: 789-794.

Vonlaufen, A., P. A. Phillips, et al. (2008). "Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance." Cancer Res **68**(19): 7707-7710.

Wang, B., H. Williams, et al. (1998). "Alternative splicing of human NrCAM in neural and nonneural tissues." Mol Cell Neurosci **10**(5-6): 287-295.

Wang, W., H. Zhao, et al. (2009). "Patterns of expression and function of the p75(NGFR) protein in pancreatic cancer cells and tumours." Eur J Surg Oncol **35**(8): 826-832.

Warszawski, N., K. H. Link, et al. (1999). "Der Einfluß der Therapie auf das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom." Strahlentherapie und Onkologie **175**(7): 315-319.

Watari, N., Y. Hotta, et al. (1982). "Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration." Okajimas Folia Anat Jpn **58**(4-6): 837-858.

Welsch, U. und J. Sobotta (2006). Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.

Wigmore, S. J., C. E. Plester, et al. (1997). "Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer." Br J Cancer **75**(1): 106-109.

Yamanaka, H., K. Obata, et al. (2007). "Alteration of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain." Eur J Neurosci **25**(4): 1097-1111.

Yi, S. Q., K. Miwa, et al. (2003). "Innervation of the pancreas from the perspective of perineural invasion of pancreatic cancer." Pancreas **27**(3): 225-229.

Yip, P. M. und C. H. Siu (2001). "PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha5beta3 interaction for neurite outgrowth." J Neurochem **76**(5): 1552-1564.

Yip, P. M., X. Zhao, et al. (1998). "The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alpha5beta3 integrin." Mol Biol Cell **9**(2): 277-290.

Zhang, Y. Y., B. Chen, et al. (2012). "Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer." Asian Pac J Cancer Prev **13**(6): 2437-2444.

Zhu, Z., H. Friess, et al. (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol **17**(8): 2419-2428.

Zhuo, M., G. Wu, et al. (2011). "Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain." Mol Brain **4**: 31.

X ANHANG

1 Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Austria</i> (Österreich)
aq. dest.	aqua destillata
BE	<i>Belgium</i> (Belgien)
CAM	Cell Adhesion Molecule
CH	<i>Confoederatio Helvetica</i> (Schweiz)
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
h	<i>hour/s</i> (Stunde/n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
hSC	<i>human Schwann Cells</i> (humane Schwannsche Zellen)
I	<i>Italy</i> (Italien)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
FMI	<i>Forward Migration Index</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GER	<i>Germany</i> (Deutschland)
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
NI	Neurale Invasion
NP	Normales Pankreasgewebe

ns	nicht signifikant
NrCAM	<i>Neuroglia-CAM-related-CAM</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCa	Pankreaskarzinom
PCC	<i>Pancreatic Cancer Cells</i> (Pankreaskarzinomzellen)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i> (Duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PSC	<i>Pancreatic Stellate Cells</i>
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TBST	<i>Tris-buffered-saline with Tween20</i>
UK	<i>United Kingdom</i> (Vereinigtes Königreich von Großbritannien und Nordirland)
USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
ZNS	zentrales Nervensystem

2 **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von NrCAM</i>	23
<i>Abbildung 2: Computerunterstützte Auswertung mittels ImageJ am Beispiel eines mit anti-L1CAM behandelten PCa-Gewebeschnittes.....</i>	46
<i>Abbildung 3: Lichtmikroskopische Beispielbilder HE-gefärbter PDAC-Gewebeschnitte</i>	48
<i>Abbildung 4: schematische Darstellung einer Wet-Blotting-Kammer.....</i>	54
<i>Abbildung 5: Beispiel eines 2%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels unter UV-Licht.</i>	59
<i>Abbildung 6: Beispielgraphen für eine mit NrCAM RT 267/268 und Light Cycler 480 SYBR Green I Mastermix durchgeführte qRT-PCR.....</i>	62
<i>Abbildung 7: schematische Darstellung einer mit hSC beschichteten 96-well-Platte</i>	67
<i>Abbildung 8: Beispielbilder eines Adhäsionsassays mit SU86.86</i>	69
<i>Abbildung 9: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Adhäsionsassays mittels ImageJ</i>	70
<i>Abbildung 10: erster Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration.....</i>	72
<i>Abbildung 11: zweiter und dritter Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit Antikörperblockade.....</i>	73
<i>Abbildung 12: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Migrationsassays mittels ImageJ („Manual Tracking“)</i>	74
<i>Abbildung 13: Beispiel für die computerunterstützte Auswertung eines Migrationsassays mittels ImageJ („Chemotaxis Tool“).....</i>	76
<i>Abbildung 14: lichtmikroskopische Beispielbilder der mit anti-NrCAM behandelten Gewebe mit Gegenfärbung</i>	79
<i>Abbildung 15: Untersuchung verschiedener Passagen hSC auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot.....</i>	80
<i>Abbildung 16: graphische Darstellung der Untersuchung verschiedener hSC Passagen auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR.....</i>	81
<i>Abbildung 17: lichtmikroskopische Beispielbilder der mit anti-L1CAM behandelten Gewebe mit Gegenfärbung</i>	82

Abbildung 18: Untersuchung verschiedener Passagen hSC auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot.....	83
Abbildung 19: graphische Darstellung der Untersuchung verschiedener hSC Passagen auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels qRT-PCR.....	84
Abbildung 20: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse mit verschiedenen hSC Passagen: NrCAM und L1CAM im Vergleich.....	85
Abbildung 21: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse von NrCAM in normalem Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomgewebe	86
Abbildung 22: Untersuchung von Pankreasgewebe auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot	87
Abbildung 23: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM im Nerven in Abhängigkeit vom Gewebe.....	87
Abbildung 24: graphische Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse von L1CAM in normalem Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomgewebe	88
Abbildung 25: Untersuchung von Pankreasgewebe auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot	89
Abbildung 26: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM im Nerven in Abhängigkeit vom Gewebe.....	89
Abbildung 27: Untersuchung von PCC auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot.....	91
Abbildung 28: graphische Darstellung der Untersuchung von SU86.86 und MiaPaCa-2 auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR	92
Abbildung 29: Untersuchung von PCC auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels Western blot.....	93
Abbildung 30: graphische Darstellung der Untersuchung von SU86.86 und MiaPaCa-2 auf das Zelladhäsionsmolekül L1CAM mittels qRT-PCR	93
Abbildung 31: Untersuchung verschiedener Proben von PSC und BJ auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels Western blot	95
Abbildung 32: graphische Darstellung der Untersuchung von hSC im Vergleich zu BJ auf das Zelladhäsionsmolekül NrCAM mittels qRT-PCR	95
Abbildung 33: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM bezüglich der neuralen Expression im Pankreaskarzinom	97
Abbildung 34: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM bezüglich der neuralen Expression im Pankreaskarzinom	98

Abbildung 35: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von NrCAM in Korrelation mit Schmerz	99
Abbildung 36: quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von L1CAM in Korrelation mit Schmerz	100
Abbildung 37: 3D in-vitro Migationsassay zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration zu T3M4 im Vergleich zu PSC	101
Abbildung 38: 3D in-vitro Migationsassay zur Überprüfung der Spezifität der hSC-Migration zu T3M4 im Vergleich zu Ln-229 (LN)	102
Abbildung 39: Adhäsionsassay mit anti-NrCAM geblockten Zellen.....	104
Abbildung 40: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.1 geblockten Zellen.....	105
Abbildung 41: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.2 geblockten Zellen.....	106
Abbildung 42: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.3 geblockten Zellen.....	106
Abbildung 43: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.4 geblockten Zellen.....	107
Abbildung 44: Adhäsionsassay mit anti-L1CAM Nr.7 geblockten Zellen.....	107
Abbildung 45: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten hSC.....	108
Abbildung 46: Ansatz des 3D in-vitro Migrationsassays mit anti-L1CAM geblockten SU86.86.....	111

XI DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger für das Interesse und die kompetente Betreuung meiner Promotionsarbeit ganz herzlich danken. Seine unkomplizierte und sympathische Art waren eine sehr große Hilfe bei der Durchführung des Projektes und der Fertigstellung der Arbeit.

Meinem Mentor, Herrn PD Dr. Güralp Ceyhan möchte ich ganz besonders für die Überlassung des höchstinteressanten Dissertationsthemas und die wunderbare Zusammenarbeit danken.

Ein sehr großer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Ekin Demir. Durch seine bemerkenswerte Faszination für meine Arbeit, konnte ich mich auch sehr schnell für dieses Projekt begeistern. Seine beeindruckende Arbeitseinstellung und Berufsauffassung, sowie unermüdliches Engagement haben mir in hohem Maße imponiert. Ohne seine außerordentliche Unterstützung und sachkundige Beratung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Ceyhan, den "Scheihan-Warriors" bedanken. Durch das angenehme und familiäre Arbeitsklima haben sich die Stunden im Labor sehr kurzweilig gestaltet. Ein großer Dank geht dabei an Frau Ulrike Bourquain, die gute Seele des Labors, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich Dr. Daniel Hartmann und Dr. Timo Kehl für die lehrreiche Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei diversen Fragestellungen. Frau Eva Brunner danke ich für die ausgesprochene Kollegialität und humorvolle Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Christine und Erwin Klose. Sie haben den Grundstein für alles gelegt, was ich bis jetzt in meinem Leben erreichen durfte. Aus tiefem Herzen möchte ich mich für ihre bedingungslose Unterstützung und tatkräftige Hilfe bedanken. Ihr Vertrauen in mich und ihre Geduld haben mir die nötige Kraft und das Selbstvertrauen gegeben alle Herausforderungen zu meistern. Danke!